

Aus dem Institut für Klinische Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

**Elektrophysiologische Untersuchungen zum
Wirkungsmechanismus von Aldosteron
auf den Kalium- und Natriumtransport im
proximalen und distalen Tubulus
der Rattenniere**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Schoormans, Wilko

Norden

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Physiologie

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

**Elektrophysiologische Untersuchungen zum
Wirkungsmechanismus von Aldosteron
auf den Kalium- und Natriumtransport im
proximalen und distalen Tubulus
der Rattenniere**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Schoormans, Wilko

Norden

Referent: Professor Dr.med. M. Wiederholt

Korreferent: Professor Dr.med.Reinhardt



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 9.7.73

Elektrophysiologische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus
von Aldosteron auf den Kalium- und Natriumtransport im proximalen
und distalen Tubulus der Rattenniere.

	Seite
<u>1 Einleitung</u>	
<u>2 Methodik</u>	
21 Material	
211 Versuchstiere	7
212 Elektroden	7
213 Chlorierung	9
214 Mikropunktionskapillaren	10
215 Blutkapillaren	11
216 Perfusionslösungen	11
217 Adrenalektomie	12
2171 Wasserversuch	12
218 Gruppeneinteilung und verabreichte Substanzen	14
22 Methoden	
221 Operatives Vorgehen	15
222 Meßanordnung	18
223 Mikropunktionsmethode	18
224 Technischer Aufbau	22
225 Peritubuläre Membranpotentialmessung	29
226 Statistik	31
<u>3 Ergebnisse</u>	
31 Meßwerte Kalium distal	32
32 Meßwerte Kalium proximal	36
33 Meßwerte Natrium distal	36
34 Meßwerte Natrium proximal	38
35 Meßwerte der peritubulären Membranpotentiale	41
36 Signifikanzberechnung	48
<u>4 Diskussion</u>	
41 Methoden	50
42 Permeabilitätsberechnung	60
43 Kaliumergebnisse	65
44 Natriumergebnisse	75
<u>5 Zusammenfassung</u>	80
<u>6 Literaturverzeichnis</u>	82

Einleitung

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß es bei Ausfall der Nebennierenrindensteroido (Morbus Addison) zu einem Abfall der Natrium- und Anstieg der Kaliumkonzentration im Plasma aufgrund einer renalen Störung kommt. Mit Hilfe von Mikropunktionsmethoden wurde der Einfluß von Aldosteron auf den aktiven Natriumtransport im proximalen und distalen Tubulus nachgewiesen (15,16,40).

Zu der Frage, ob Aldosteron die Permeabilität für Ionen an der Tubuluszellmembran beeinflusst, sind Mikropunktionsmessungen durchgeführt worden. Aufgrund von Gleichgewichtsmessungen und Messungen der Ausstromrate an proximalen Tubuli adrenaletomierter Ratten wurde eine Abnahme des passiven Rückstroms postuliert (15). Dahingegen wurde mit Isotopenflußmessungen am Sammelrohr (34) gezeigt, daß Aldosteron eine Verminderung der Natriumpermeabilität bewirkt, wobei sich ein signifikanter Unterschied nur im Vergleich zwischen Kontrolltieren, die mit Aldosteron substituiert worden waren und adrenaletomierten Tieren ohne Aldosteronsubstitution darstellte. Kein Unterschied bestand zwischen Kontrolltieren und adrenaletomierten Tieren und auch nicht zwischen Kontrolltieren mit und ohne Aldosteronsubstitution.

GUTSCHE et al. (13) fanden bei ihren Permeabilitätsmessungen mit Hilfe von elektrophysiologischen Methoden an Rattennieren eine Abnahme der Wandpermeabilität des proximalen Tubulus für den passiven Ioneneinstrom in der Nebennierenrindeninsuffizienz. Ausführliche Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Aldosteron auf den Natriumtransport wurden an isolierten Membranen von Kaltblütern durchgeführt (4,6,26,27).

Zur Zeit ist nicht geklärt, ob Aldosteron die Permeabilität für Natrium direkt oder über eine Änderung der Proteinsynthese beeinflusst.

Zur Beantwortung der Frage, ob Adrenalectomie und Aldosteron die Permeabilität für Natrium und Kalium am proximalen und distalen Tubulus beeinflussen, wurden proximale und distale Tubuli an Rattennieren mit verschiedenen Kalium- und Natriumkonzentrationen durchströmt und die bei Änderung der Konzentration auftretenden Änderungen der transtubulären Potentialdifferenz registriert. Außerdem wurde das Membranpotential der peritubulären Zellseite bei den verschiedenen Versuchsgruppen gemessen.

Aufgrund der gemessenen relativen Permeabilitäten muß man annehmen, daß Aldosteron sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus die relative Kalium- und Natriumpermeabilität erhöht. Die verminderte Sekretion von Kalium in der Nebennierenrindeninsuffizienz ist auf eine verminderte Durchlässigkeit der luminalen Membran im distalen Tubulus und auf eine Reduzierung der aktiven Aufnahme von Kalium in die Zelle an der peritubulären Seite zurückzuführen. Durch akute Verabreichung von Aldosteron wird vorwiegend die relative Permeabilität für Kalium an der luminalen Zellseite des distalen Tubulus erhöht.

2 Methodik

Um die Permeabilität von Kalium und Natrium am proximalen und distalen Tubulus in Abhängigkeit von Aldosteron zu erfassen, war es notwendig, ein bekanntes und konstantes Ionenangebot intraluminal zu applizieren.

Dazu wurden proximale und distale Tubuli mit Mikropunktionskapillaren punktiert und mit verschiedenen Lösungen perfundiert. Um eine Änderung der transepithelialen Potentialdifferenz (Δ PD) messen zu können, mußte der Tubulus mit Lösungen unterschiedlicher Ionenkonzentration durchströmt werden.

21 Material

211 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Ratten einer Wistar-Kolonie (Fa. Mus Rattus A.G., Brunnthal).

Verwendet wurden nur männliche Tiere mit einem Körpergewicht von 180 - 220 g.

Die Ernährung erfolgte durch Trockenpressfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe, Typ R10, Serie 1310, Natriumgehalt: 3100 - 3200 mg/kg; Kaliumgehalt : 7700 mg/kg) und Leitungswasser, das bei der Gruppe der adrenaletomierten Tiere gegen 0,9 % NaCl-Lösung ausgetauscht wurde (s.u.). Alle Tiere hatten bis zum Experiment freien Zugang zu Futter und Wasser.

212 Elektroden

Zur Herstellung der Mikropunktionselektroden wurden Pyrex-Kapillargläser mit einem Außendurchmesser von 1,21 mm (Wandstärke 0,32 mm) (Fa. Corning glass works, New York, USA, Bestellnr.: 7740) in einem vertikalen Kapillarausziehgerät (Fa. Müller, Apparatebau, Allershausen, Typ 32) eingespannt und ausgezogen. Mit einer nach TASAKI (33) modifizierten Methode wurden die ausgezogenen Kapillargläser in einen speziell dafür angefertigten Kunststoffhalter gebracht und in ein gesäubertes und getrocknetes Glasgefäß gestellt. Glasgefäß und Kapillaren wurden in einer bis auf 10^{-2} atm. evakuierten Kammer (Pumpe: Fa. Heraeus, Typ Thermistorvac 1) über ein Zulaufrohr mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, die durch einen Sartorius-Membranfilter (Porendurchmesser 0,001 μ) floß.

24 Stunden nach dem Füllen waren diese Kapillaren als Elektroden verwendbar.

Diese Zeit war notwendig, um mikroskopisch kleinen Luftblasen die Möglichkeit zum Lösen zu geben. Beim Versuch selbst konnte an Hand des Spitzenwiderstandes der Durchmesser der Elektrodenspitze bestimmt werden.

Der Spitzendurchmesser errechnet sich aus dem Ohm'schen Widerstand:

$$R = \frac{1}{F} \cdot \frac{1}{\kappa} ; \text{ bei } F = \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot \pi \text{ wird}$$

F = Leiterquerschnitt

d = Durchmesser in m

$$1 = 4 \cdot 10^{-5} \text{ m}$$

(Der Teil der Elektrode, der den geringsten

Durchmesser hat, bestimmt den Gesamtwiderstand:

in einer Serienschaltung ist der größte Widerstand ausschlaggebend)

κ = spezifische Leitfähigkeit in $\text{Ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$$R = \frac{4}{\pi \cdot \kappa} \cdot \frac{1}{d^2}$$

$$R \approx \frac{1}{d^2}$$

Beispiel für die Berechnung eines Spitzendurchmessers für $R_{sp.} = 20 \text{ MOhm}$:

$$d^2 = \frac{4}{R \cdot \pi \cdot \kappa} \quad \kappa \text{ für } 3 \text{ M KCl} = 0,2 \cdot 10^2 \text{ Ohm}^{-1} \text{ m}^{-1} \quad (19)$$

$$d^2 = \frac{16 \cdot 10^{-5}}{2 \cdot 10 \cdot 3,14 \cdot 2 \cdot 10^7} \quad \left[\frac{\text{m Ohm m}}{\text{Ohm}} \right]$$

$$d^2 = 1,3 \cdot 10^{-13}$$

$$d = \sqrt{13 \cdot 10^{-14}}$$

$$d = 3,6 \cdot 10^{-7}$$

$$d = 0,36 \cdot 10^{-6}$$

$$d = 0,36 \mu$$

Bei einem Spitzenwiderstand von 20 MOhm beträgt der Spitzendurchmesser 0,36 μ .

Zur Verwendung kamen nur Elektroden mit einem gemessenen Spitzenwiderstand (s. Kapitel 224) von 8-25 MOhm $\hat{=}$ 0,2 - 0,5 μ .

An einer Ling-Gerard'schen Elektrode entstehen aufgrund der membranartigen Verhältnisse an der Spitze (7) Potentiale, die sich zum Potential des Gesamtaufbaues addieren. Diese Potentiale konnten an der Meßeinrichtung kompensiert werden. Es wurden nur Elektroden mit Spitzenpotentialen von weniger als 10 mV benutzt. In den meisten Fällen war das Spitzenpotential < 3 mV.

Bei kühler Lagerung (3° C) waren die Elektroden bis zu 3 Wochen verwendungsfähig, ohne ihre anfangs gemessenen Werte zu verändern. Darüber hinaus Gelagerte zeigten eine vermehrte Glasbrüchigkeit und eine Zunahme des Spitzenwiderstandes.

213 Chlorierung der Ag/AgCl Elektrodenflächen

Die im technischen Aufbau unter 222 beschriebenen Ag/AgCl Elektrodenflächen unterlagen einer natürlichen Abnutzung: Durch unterschiedliche Veränderungen an den Silberchloridflächen beider Elektroden im Versuchs-

aufbau kam es zu Asymmetriepotentialen.

Da die Ag/AgCl Elektrodenflächen für das Gelingen des Versuchs von ausschlaggebender Bedeutung war, soll hier auf die Chlorierungsmethode genauer eingegangen werden:

Die Silberchloridfläche wurde mit Kreide manuell abgeschliffen bis man unter dem Mikroskop eine glatte Silberfläche bekam. In einem 0,9 % NaCl-Bad, an dessen Boden eine Silberplatte als Minuspol eines Gleichspannungsgerätes lag, erfolgte dann die Chlorierung:

Die Elektrodensilberfläche, verbunden mit dem Pluspol des Gerätes, wurde in das Bad gesenkt.

Dabei richtete sich die Chlorierungsdauer der Fläche nach: 1 cb/cm^2 (1 Asec/cm^2), wie es von MOORE et al. (22) beschrieben wird.

Die Elektrodensilberfläche betrug $0,56 \text{ mm}^2$. Erfahrungen haben gezeigt, daß zur möglichst gleichmäßigen Chlorierung ein möglichst kleiner Strom fließen sollte.

Bei einem Strom von $1,4 \mu\text{A}$ ($U = 200 \text{ mV}$) beträgt die Chlorierungsdauer der angegebenen Fläche 90 Minuten. Bei kürzerer Chlorierungszeit und damit größerem Stromfluß war die Gefahr gegeben, daß sich allzu große Silberchloridkristalle an die Silberfläche lagerten und die elektrischen Bedingungen bei der Messung stark beeinflussten, was zu einem großen Asymmetriepotential führte.

214 Mikropunktionskapillaren

Das für die Mikroperfusion verwendete Glas hatte einen Außendurchmesser von 1 mm und einen Innendurchmesser von 0,7 mm (Fa. Scientific Glass Apparatur, Bloomfield, New Jersey, USA, Bestellnummer: 46485).

In einer horizontalen Schmelz- und Ausziehapparatur (Fa. W. Hampel, Frankfurt/Main) wurden die Glaskapillaren auf einen Spitzendurchmesser von $6-8 \mu$ gebracht und auf einer mit Aqua dest. befeuchteten Steinschleif-

scheibe (Fa. Klotz, München) unter mikroskopischer Kontrolle angeschliffen,

Nach dem Anschleifen wurde die Spitze mit Chromschwefelsäure, zweimal Aqua dest. und Aceton durch Aspirieren und Ausblasen gesäubert und getrocknet.

Der Spitzendurchmesser der im Versuch verwendeten Punktionskapillaren lag dann zwischen 8 und 12 μ .

215 Blutkapillaren

Die Blutkapillarröhrchen (Fa. Scientific Glass Apparatur, Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 1,2 mm) wurden mit einer 2 %igen Kalzium-Heparinlösung (Fa. Hoffmann - La Roche, Grenzach) heparinisiert und über eine Wasserstrahlpumpe getrocknet. Das Blutvolumen (ca. 13 mm³) in diesen Röhrchen war ausreichend für die flammenfotometrische Plasmaelektrolytbestimmung.

216 Perfusionslösungen

Zur Tubulusperfusion wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung I (1,5 mM K): 0,75 mM K₂SO₄, 297,75 mM Cholinsulfat.

Lösung II (15 mM K): 7,5 mM K₂SO₄, 278,5 mM Cholinsulfat.

Lösung III (150 mM K): 75 mM K₂SO₄.

Lösung IV (1,5 mM Na): 0,75 mM Na₂SO₄, 297,75 mM Cholinsulfat.

Lösung V (150 mM Na): 75 mM Na₂SO₄.

Bei den Lösungen mit 1,5 mM und 15 mM wurde Cholin als zusätzliches Kation gewählt. In allen Lösungen war Sulfat das nicht permeierende Anion.

Cholinsulfat wurde durch Titration von Cholinbikarbonat gewonnen. Die

Osmolalitäten der Lösungen lagen bei 300 mOsmol. Den Lösungen III und V wurde Lissamingrün in einer Konzentration von 0,25 % zugefügt, um die Darstellung von Tubulusabschnitten zu erleichtern. Über Spritzen mit Mikroporfiltrervorsätzen (Fa. Sartorius, Porengröße 0,1 μ) wurden die Lösungen unmittelbar vor dem Experiment in die Perfusionskapillaren eingebracht.

217 Adrenalektomie

Mindestens 8-10 Tage vor dem Experiment wurden Ratten bilateral in Äthernarkose adrenalektomiert. Postoperativ wurden die Tiere von Leitungswasser auf 0,9 % NaCl-Lösung als Trinkwasser umgestellt, um den Natriumverlust in der Nebenniereninsuffizienz auszugleichen.

2171 Wasserversuch

In einem Versuch mußte der Nachweis der funktionell wirksamen Adrenalektomie erbracht werden. Dabei bedient man sich der Tatsache, daß in der Nebenniereninsuffizienz zugeführtes Wasser gegenüber Kontrollen verzögert ausgeschieden wird.

Die verzögerte Wasserausscheidung nach Adrenalektomie ist auf eine Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate (37), eine vermehrte Flüssigkeitsrückresorption im proximalen Tubulus (31, 37) und eine erhöhte Wasserpermeabilität des distalen Tubulus (31) zurückzuführen. In einem Wasserbelastungstest wurde, wie im Labor üblich, die verzögerte Wasserausscheidung der Tiere gemessen. Die Abbildung 1 zeigt in Übereinstimmung mit STOLTE et al. (31) die deutlich verzögerte Wasserausscheidung der adrenalektomierten Tiere (rechte Kurvengruppe) gegenüber Kontrolltieren (linke Kurvengruppe).

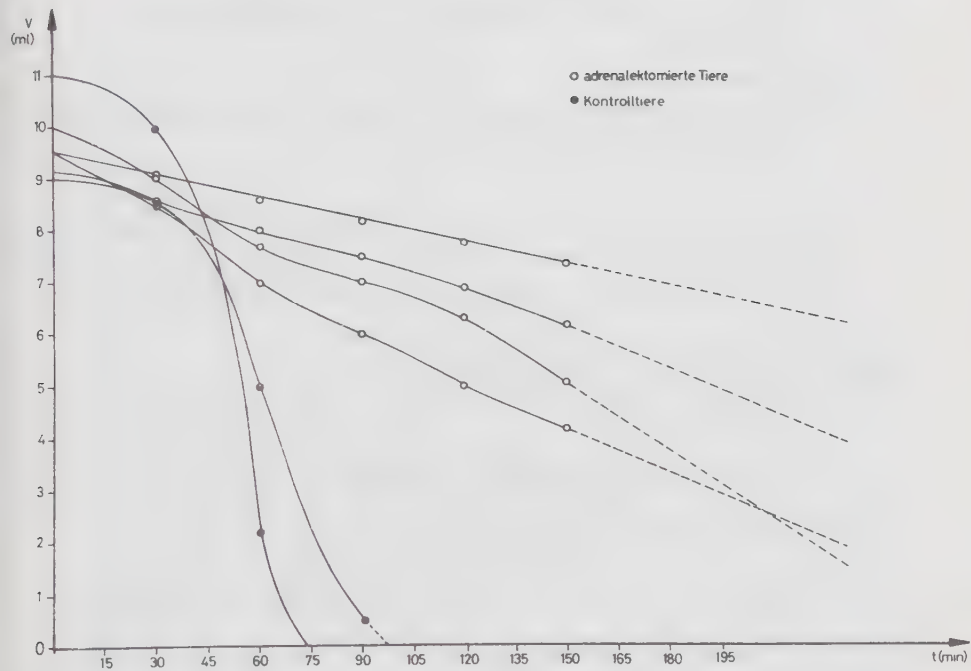


Abb. 1 : Wasserausscheidung bei Kontrollen und adrenalectomierten Tieren.

218 Gruppeneinteilung und verabreichte Substanzen

Folgende Gruppen wurden bezüglich der Kalium- und Natriumpermeabilität ihrer Tubulusmembran untersucht:

Kontrolltiere.

Hierbei handelt es sich um Ratten, die mit Standardfutter ernährt wurden.

Adrenalektomierte Tiere.

Es wurden nur Tiere verwendet, bei denen eine verzögerte Wasserausscheidung nachgewiesen worden war.

Eine weitere Kontrollmöglichkeit für eine erfolgreiche Adrenalektomie ergab die flammenfotometrische Analyse der Plasmaelektrolyte dieser Gruppe. Dabei betrug die Elektrolytkonzentration für Natrium im Mittel 131 mM, für Kalium im Mittel 6 mM.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.

1 1/2 Stunden vor Beginn der Messungen wurde den nicht narkotisierten Tieren über die Schwanzvene $5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körpergewicht einer wässrigen Aldosteronlösung (Aldocorten^R, Fa. Ciba) injiziert.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.m.

Diesen Tieren wurde Aldosteron zweimal täglich 3 Tage vor dem Experiment in einer öligen Suspension (Aldosteron, TMA, Fa. Ciba) $15 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körpergewicht i.m. verabreicht.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron + Cycloheximid i.v.

Die nicht narkotisierten Tiere bekamen über die Schwanzvene unmittelbar nach der Aldosterongabe zusätzlich Cycloheximid (Fa. Sigma Chemical, Company) injiziert ($100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körpergewicht).

Kontrolltiere + Cycloheximid i.a.

Normaltieren wurde über eine Stahikanüle (40 u Φ , Fa. Hamilton, USA) $50 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Körpergewicht Cycloheximid in die Arteria renalis

der zur Untersuchung anstehenden Niere injiziert.

Kontrolltiere + Actinomycin D i.v.

Kontrolltiere bekamen während des Versuchs 1 1/2 Stunden vor der ersten PD-Messung 100 µg/100 g Körpergewicht Actinomycin D (Fa. Merck, Sharp & Dohme) in die Vena jugularis injiziert.

22 Methoden

221 Operatives Vorgehen

Als Narkotikum wurde den Tieren Inactin (Natriumsalz der 5-Aethyl-5-(1-methyl-propyl)-2-thio-barbitursäure der Fa. Promonta, Hamburg) intraperitoneal verabreicht.

Während Kontrolltieren eine Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht gegeben wurde, genügte bei adrenalectomierten Tieren etwa die halbe Dosis.

Auf einem vorgewärmten Operationstisch aus PVC wurde das Tier in Rückenlage gebracht. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena jugularis. Sofort nach der Blutentnahme wurde der Ratte 1,0 ml einer 0,9 %igen NaCl-Lösung langsam über den Venenkatheter infundiert. Die Infusion wiederholte sich in gleicher Weise in 1/4 stündigem Abstand, bis insgesamt eine Menge von 2 ml/100 g Körpergewicht verabreicht worden war. Diese Infusion diente dem Ausgleich des während des Versuchs auftretenden Volumenverlustes.

Die Urinausscheidung betrug unter diesen Versuchsbedingungen im Mittel 2 µl/Niere und Minute. Die Elektrolytausscheidung ist in Abbildung 2 dargestellt.

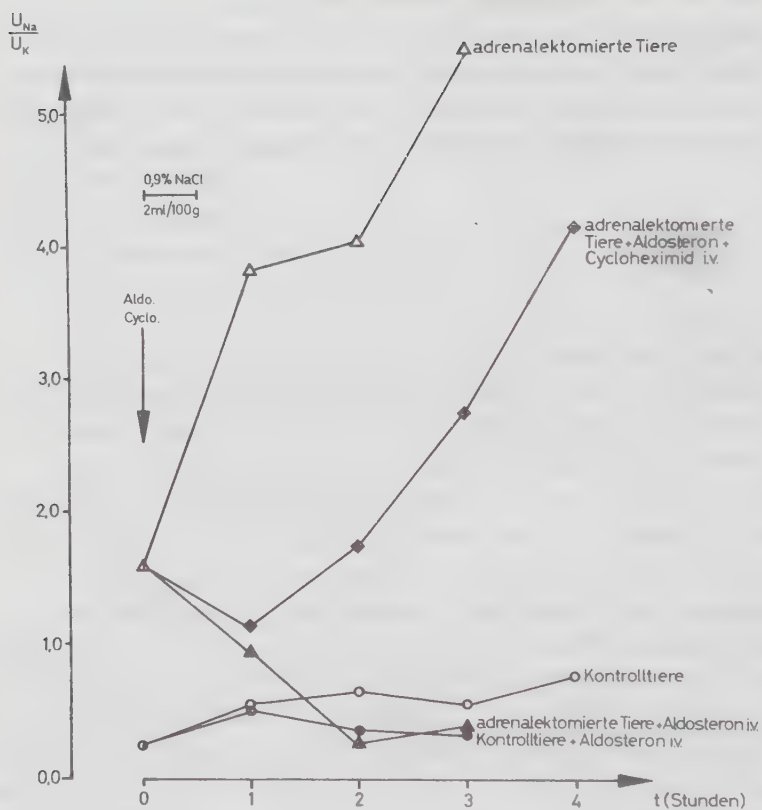


Abb. 2 : Natrium- und Kaliumausscheidung bei allen Versuchsgruppen.

Nach der Blutentnahme wurde eine Tracheotomie durchgeführt und wenn nötig abgesaugt. Das Absaugen mußte vor Anlegen der Trachealkanüle geschehen, um zu verhindern, daß mit der Kanüle Schleimpfropfen tiefer in den Bronchialstamm geschoben wurden.

Mit einem Flankenschnitt parallel und unterhalb des unteren Rippenbogens wurde das Abdomen eröffnet, die linke Niere von ihrer Fettkapsel befreit und in eine mit Watte ausgelegte, kochsalzangefeuchtete Plastikschale entsprechender Größe und Form gelegt, die über einen Stil am Operationstisch befestigt war. Über einem Einschnitt der Schale lagen alle Hilusgefäße, so daß der Ureter katheterisiert, Urin gesammelt werden konnte, und eine Verabreichung von Pharmaka in die Nierenarterie möglich war.

Anschließend wurde die Niere dekapsuliert und mit 1,5 %igem Agar Agar, der nach dem Aufkochen in 0,9 % NaCl auf 38 °C abgekühlt war, eingebettet.

Nach dem Erstarren des Agars konnte der über der Nierenoberfläche befindliche Teil abgehoben und die Niere in ihrer Schale mit auf 37 °C vorgewärmter Kochsalzlösung umspült werden, wobei eine Wasserstrahlpumpe für den Abtransport der überfließenden Flüssigkeit sorgte.

Mit 0,05 ml einer 10 %igen mit Tris gepufferten Lissamingrönlösung wurden die Passagezeiten ermittelt, wie sie von STEINHAUSEN (30) beschrieben wurden.

Dabei wurden im Einzelnen folgende Zeiten gemessen:

Kontrolltiere proximal im Mittel	9,2 sec.
Kontrolltiere distal im Mittel	47,5 sec.
Adrenalektomierte Tiere proximal im Mittel	22,6 sec.
Adrenalektomierte Tiere distal im Mittel	82,4 sec.

Mit Hilfe der Passagezeitbestimmung bekam man eine Aussage über den Funktionszustand der Niere.

222 Meßanordnung

Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Anordnung der Perfusionskapillaren und der Elektrode im Tubuluslumen. Gemessen wurde das transtubuläre (transepitheliale) Potential, wobei der peritubuläre Pol durch die Referenzelektrode an der Blutseite (Schwanzende) hergestellt und der Meßpol über die Elektrodenspitze gebildet wurde.

In den Abbildungen 13a-d ist schematisch dargestellt, wie sich das so gemessene transtubuläre Potential des distalen Tubulus als Potentialdifferenz von dem luminalen und peritubulären Membranpotential versteht.

Dabei wurde angenommen, daß der gesamte transepitheliale Widerstand vorwiegend durch die Widerstände der luminalen und peritubulären Membran gebildet wird, d.h., daß kein nennenswerter interzellulärer Shunt (44) besteht.

Dadurch, daß intraluminal mit unterschiedlicher Ionenkonzentration perfundiert wird, kann an der Reaktion der Elektrodenspitze, - Abhängigkeit der Δ PD und des Spitzenwiderstandes von der Konzentration des Perfusates, - eine eindeutige Lokalisation ausgemacht werden (12).

223 Mikropunktionsmethode

Betrachtet man die Nierenoberfläche der Ratte unter dem Stereomikroskop (Fa. Leitz, Wetzlar), so stellen sich deutlich die einzelnen Tubulusabschnitte dar. Von diesen Tubuli sind jedoch nur 5-10 % distaler Natur, während der überwiegende Teil proximale Tubuli sind.

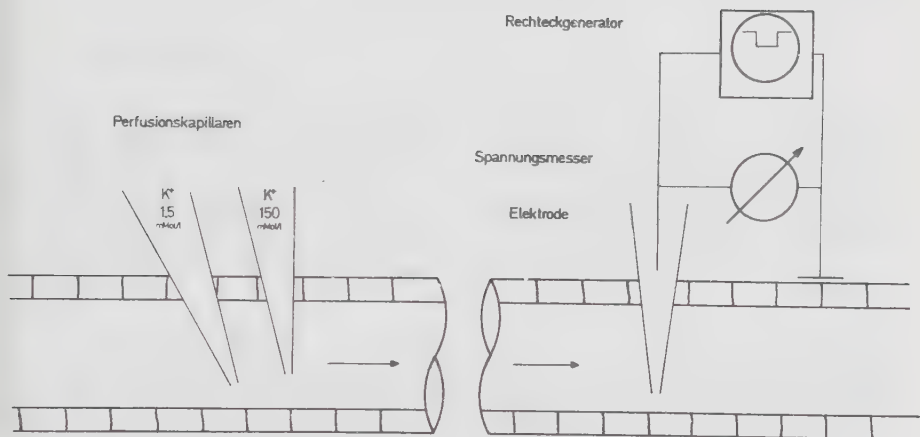


Abb. 3 : Anordnung der Perfusionskapillaren und der Elektrode im Tubulus während der Messung.

Bei proximaler PD-Messung war es einfach, die zu einem Nephron gehörenden proximalen Anteile zu finden: Es ergab sich zunächst aus der konzentrischen Anordnung der Tubuli und ihrem hellen Bürstensaum. Zum anderen war eine der beiden Perfusionslösungen (Lösung III: 150 mM K; Lösung V: 150 mM Na) mit Lissamingrün (0,25 %) angefärbt, so daß sich nach Perfusion mit dieser Lösung eine eindeutige Zugehörigkeit einzelner Tubulusschlingen zu einem Nephron ergab.

Somit konnten also in den einen proximalen Abschnitt die beiden Perfusionskapillaren gebracht werden, während im zugehörenden stromabwärts gelegenen (proximalen oder distalen) Tubulusabschnitt die Elektrode lag. Ein Einstechen beider Kapillaren und der Elektrode in einen Tubulusabschnitt war nicht möglich, weil dabei häufig größere Löcher in den Tubuluszellverband gerissen wurden, so daß die PD aufgrund des Leckstromes abfiel.

Schwieriger gestaltete sich die Messung der PD am distalen Tubulus. Distale Tubuli wurden identifiziert durch intravenöse Verabreichung von 0,05 ml einer 2 %igen gepufferten Lissamingrünlösung oder aufgrund ihrer helleren Transparenz infolge des fehlenden Bürstensaumes.

Da nur sehr selten ein distaler Tubulus mit zwei oberflächlichen Schlingen nachweisbar ist, wurde eine einzelne Schlinge perfundiert und an ihr die PD gemessen.

Bei dieser Methode kam es häufig zu instabilen Werten und zu einem Abfall der PD. Um eine mögliche Leckbildung auszuschließen, wurden deshalb distale Tubuli durch die Henle'sche Schleife von einem am Ende des proximalen Konvolut gelegenen Segmentes aus perfundiert. Bei der Durchströmung distaler Tubuli vom distalen Tubulus aus mit Lösungen,

die 150 mM K^+ oder 1,5 mM K^+ enthielten, ergab sich eine Änderung der transtubulären PD (Δ PD) von $44 \pm 1,5$ mV (Tab.1). Dieser Wert ist signifikant ($P < 0,001$) niedriger als Δ PD des distalen Tubulus ($52,9 \pm 0,96$ mV), bei Durchströmung vom proximalen Tubulus aus (Tab.1.).

Die Ergebnisse zeigen, daß tatsächlich bei Perfusion des distalen Tubulus vom distalen Tubulus die Gefahr besteht, daß Punktionslöcher aufgerissen werden, die infolge des Leckstromes zu einer Abnahme der transtubulären PD führen.

Die Gefahr eines transtubulären Kurzschlusses, der den tubulären Wallwiderstand so stark erniedrigt, daß die PD erniedrigt wird, ist im distalen Tubulus besonders groß, da die Längskonstante mit $300-500 \mu$ (LANGE u. HEGEL bzw. MALNIC u. GIEBISCH, pers. Mitteilung) erheblich größer ist als im proximalen Tubulus mit 70μ .

Um zu testen, ob bei der Passage durch den proximalen Tubulus und die Henle'sche Schleife die Perfusionslösung evtl. verändert wird, wurden 10 Tubuli vom Ende des proximalen Konvolutes mit der Lösung 1,5 mM K^+ (0 mM Na^+) durchströmt und die distal aspirierte Flüssigkeit mit einem Mikroflammenfotometer analysiert (Fa. Hampel, Frankfurt/Main, Methode nach MUELLER (23) und MALNIC et al. (21)).

Dabei ergab sich in der aspirierten Flüssigkeit eine Kaliumkonzentration von 0,8 - 2,0 mM ($1,44 \pm 0,6$ mM). Die Natriumkonzentration betrug bei 7 Messungen 0 mM und lag bei 3 Messungen zwischen 3 und 7 mM. Eine signifikante Veränderung der Perfusionslösung bei der Passage durch die Henle'sche Schleife fand demnach bei hohen Perfusionsraten nicht statt.

Zur Messung der PD wurde deshalb eine Perfusionsrate (ca. 50 nl/min)

gewählt, bei der eine Veränderung der Perfusionslösung durch das Tubulusepithel ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund dieser Versuche wurden alle Messungen der distalen PD mit Perfusion von proximal ermittelt. Alle Punktionen wurde im mittleren und letzten Drittel des distalen Tubulus durchgeführt, in einem Bereich also, in dem nach WRIGHT (44) die PD längenunabhängig ist.

Ein schädigender Einfluß von Lissamingrün in den Perfusionslösungen ist nicht anzunehmen, da die Konzentration von Lissamingrün mit 0,25 % weit unter der Konzentration liegt, die am Nierentubulus (10) den aktiven Transport hemmt. Außerdem wurden Versuche durchgeführt, in denen die PD über lange Zeit (5-10 Minuten) beliebig oft reproduzierbar blieb.

224 Technischer Aufbau

Die Schwanzspitze der Ratte wurde abgeschnitten und das stumpfe Ende in ein Bad mit 0,9 % NaCl-Lösung gebracht, das über einen Agar-KCl-Heber mit einer 3 M KCl-Lösung verbunden war. In das 3 M KCl-Bad tauchte die Erdreferenzelektrode der Meßgeräte mit ihrer Ag/AgCl-Fläche ein und stellte damit den peritubulären Pol für die Potentialdifferenzmessung dar (Abb.4).

Der intraluminal Pol wurde durch Einstechen in das Tubuluslumen mit einer Ling Gerard'schen Mikroelektrode geschaffen. Diese Elektrode stand mit ihrer 3 M KCl-Lösung über einen mit der gleichen Lösung gefüllten Elektrodenhalter (Typ EH-1 R/S, Fa. W-P Instruments, Connecticut, USA) in Verbindung zu einer Ag/AgCl-Fläche und hatte damit Anschluß an die Verstärkereinrichtung.

In diesem Kreis sollte wegen seines symmetrischen Aufbaus kein Poten-

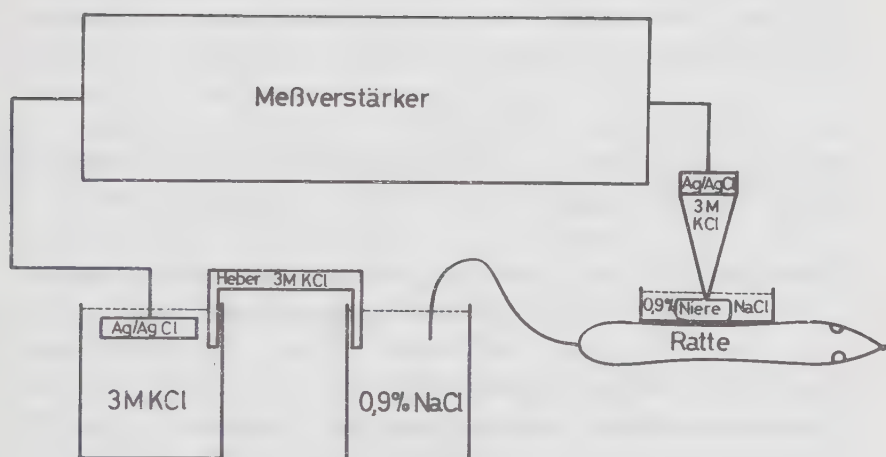


Abb. 4 : Meßanordnung

tial gemessen werden, vorausgesetzt, daß die sich entsprechenden Lösungen dieselbe Konzentration haben. Das traf nur bedingt zu, weil einerseits die Konzentrationen der Lösungen durch Verdunsten des Wassers verändert wurden und andererseits die chlorierten Silberflächen beider Elektroden nie ideal gleich waren. Man maß deshalb ein Asymmetrie-potential von 1-3 mV.

Es war weiterhin zu erwarten, daß sich bei den Perfusionsbedingungen ein freies Diffusionspotential bei Lage der Elektrodenspitze im Tubuluslumen ausbildete (Liquid junction Potential).

Beim Durchströmen des Tubulus würden die verschiedenen Natrium- und Kaliumperfusionslösungen mit ihren jeweiligen Anteilen an Sulfationen und Cholinmolekülen außerdem einen Einfluß auf die Meßwerte haben.

Deshalb wurden in vitro-Versuche durchgeführt, um das Liquid junction Potential der verschiedenen Perfusionslösungen zu ermitteln.

Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

3 M KCl	gemessen gegen	NaCl (150 mM)	=	-3 mV
"	"	" Lösung I	=	-3 mV
"	"	" Lösung III	=	-5 mV
"	"	" Lösung IV	=	-5 mV
"	"	" Lösung V	=	-7 mV

Die transtubulären PD wurden um den Betrag des jeweiligen Liquid junction Potential nicht korrigiert. Die über die Ling Gerard'sche Mikroelektrode gemessenen Potentialdifferenzen (PD) wurden über einen Vorverstärker dem eigentlichen Hauptverstärker zugeführt (Fa. W.-P. Instruments, Hamden, Conn., USA, Typ M 4).

Der Vorverstärker diente gleichzeitig als Halterung für den Elektroden-

halter, so daß evtl. auftretende Störspannungen durch eine kurze Leitung, - Meßelektrode-Verstärkereinheit -, unterdrückt werden konnte. Die eigentliche, im Hauptverstärker zu verstärkende Spannung war somit kaum anfällig gegen Störspannungen.

An dieser Verstärkereinheit war ein Kathodenstrahloszillograph (Fa. Tektronix, USA, Typ 565 Dual Beam Oscilloscope) mit eigener Verstärkereinheit (Typ 3A3 Dual Trace Differential Amplifier derselben Fa.) angeschlossen.

Mit einer zusätzlichen Einrichtung war es möglich, während der Untersuchungen den Spitzenwiderstand der Meßelektrode zu bestimmen:

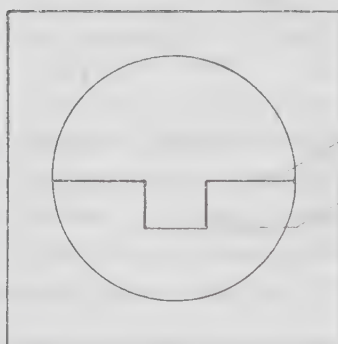
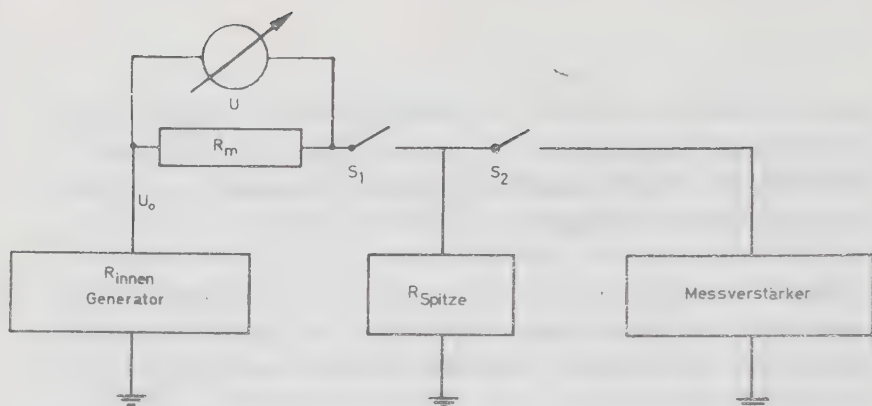
Über einen Pulsgenerator (Fa. Tektronix, USA, Typ 161) und einen Rechteckgenerator (Fa. dto., Typ 162) konnte die Meßreihe kurzzeitig während des Durchlaufs des Elektronenstrahls auf dem Bildschirm unterbrochen werden und der Elektrodenwiderstand über den Spannungsabfall nach vorheriger Eichung direkt abgelesen werden:

Der Meßverstärker mißt bei geschlossenem Schalter S_2 und geöffnetem Schalter S_1 die Spannung, die zwischen der Glaselektrode und der Erdreferenzelektrode anliegt. Wird S_2 geöffnet und S_1 geschlossen, so wird der Spannungsabfall der Generatorspannung U_0 über dem bekannten Widerstand R_m gemessen, während die Spannungsmessung der Elektrode unterbrochen wird. Dieser Spannungsabfall ist abhängig vom Spitzenwiderstand der Elektrode.

Unter der Voraussetzung $R_{\text{innen}} + R_m \ll R_{\text{Spitze}}$ gilt:

$$U = R_m \cdot I$$

U = Spannungsabfall am Widerstand R_m



- Spannungsmessung der Elektrode
- Spannungsabfall während der Impulsdauer = Widerstandsmessung

Abb. 5 : Schaltungsprinzip und Oszillographenbild.

I = Strom im Schaltkreis bei S_1 geschlossen, abhängig von der Summe aller Widerstände im Schaltkreis.

$$I = \frac{U_o}{R_{\text{innen}} + R_m + R_{\text{Spitze}}}$$

$$U = \frac{R_m \cdot U_o}{R_{\text{innen}} + R_m + R_{\text{Spitze}}}$$

$$U = \frac{U_o \cdot R_m}{R_{\text{Spitze}}}$$

$$R_{\text{Spitze}} = \frac{U_o \cdot R_m}{U}$$

Durch eine Schaltung im Meßverstärker war es möglich, Meßspannung und Widerstandsmessung auf einem Oszillographen darzustellen (5). Die Abb.5 zeigt das vereinfachte Schaltprinzip und das Oszillographenbild während einer Messung.

Zur Auswertung und Dokumentation wurden alle Meßergebnisse über einen Direktschreiber (Fa.Schwarzer, München, Typ Physiopolygraph Varioskript 442) registriert.

Die Abb. 6 zeigt eine Originalregistrierung. Aufgetragen sind die Spannungs- und Widerstandseichnungen, die Papiervorschubgeschwindigkeiten, sowie die PD beim Durchströmen des Tubulus mit unterschiedlichen Perfusionslösungen.

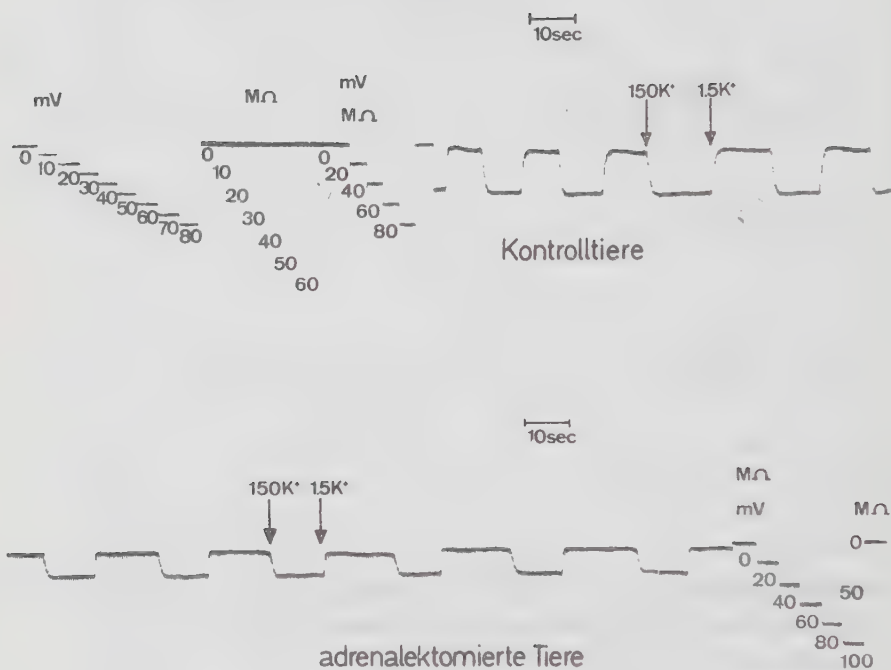


Abb. 6 : Originalregistrierung von Kontrolltieren und adrenalektomierten Tieren.

225 Peritubuläre Membranpotentialmessung

Aus der Meßanordnung unter 222 geht hervor, daß bei Lage der Elektrodenspitze im Tubuluslumen stets nur eine transtubuläre PD gewonnen werden kann. Will man Aussagen über das Verhalten der luminalen Tubuluszellmembran unter verschiedenen Bedingungen machen, so ist es notwendig, die jeweiligen Veränderungen an der peritubulären Membran zu untersuchen.

Deshalb wurde bei Kontrolltieren, adrenaletomierten Tieren und adrenaletomierten Tieren + Aldosteron i.v. das Verhalten der peritubulären Membran untersucht.

Die Meßanordnung war dieselbe wie bei der transtubulären PD-Messung, jedoch mit dem Unterschied, daß versucht wurde, die Spitze der Ling Gerard'schen Elektrode in die Tubuluszelle zu bringen.

Dabei wurde versucht, die Tubuluszelle möglichst flach zu punktieren. Abb.7 zeigt mehrere Originalregistrierungen. Im proximalen Tubulus konnte ein stabiles peritubuläres Membranpotential nur in einem von 20-25 punktierten Tubuli gemessen werden. In den meisten Fällen brach das Potential innerhalb von weniger als einer Sekunde vollständig zusammen.

Die Abb.7 A zeigt eine Registrierung der Potentialdifferenz an der peritubulären Membran eines proximalen Tubulus. Hier war das Potential über 10 Sekunden konstant und fiel dann langsam ab. Im distalen Tubulus war es häufiger als im proximalen Tubulus möglich, über mehr als 1 sec. ein konstantes Potential zu registrieren (B). Meistens kam es zu einem langsamen Abfall des Membranpotentials (C). Für die Berechnung des peritubulären Membranpotentials im proximalen und distalen Tubulus wurden

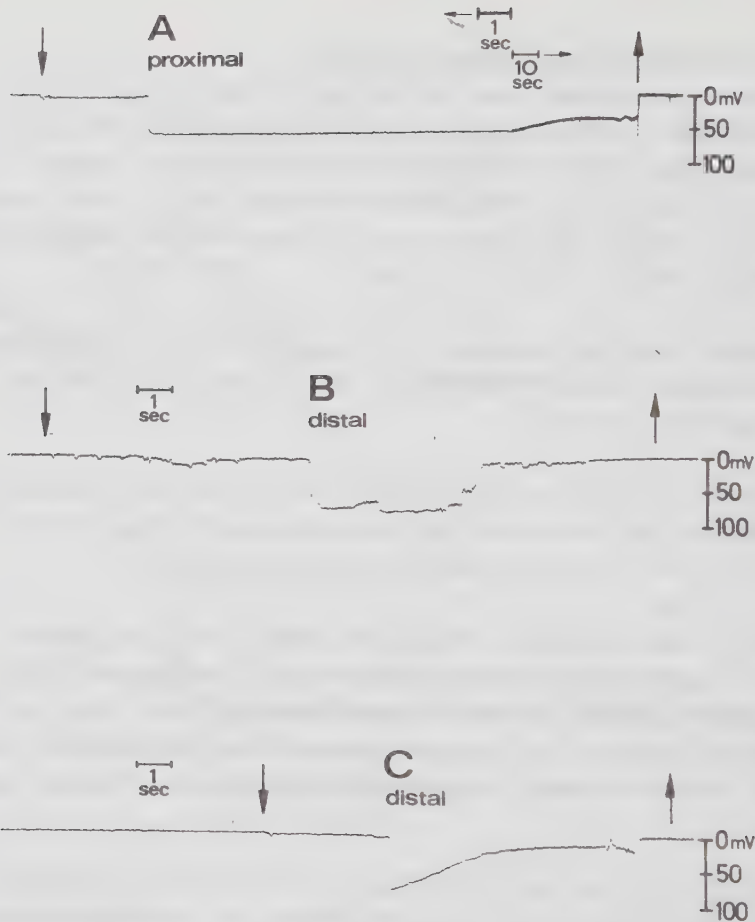


Abb. 7a : Originalregistrierung des peritubulären Membranpotentials
 am proximalen Tubulus,
 7b : am distalen Tubulus,
 7c : typischer Verlauf

nur Werte verwendet, in denen das Potential über mindestens 1 sec. nicht mehr als 10 % abfiel.

226 Statistik

Für alle Mittelwerte wurde der mittlere Fehler des Mittelwertes (SE) berechnet. Die Beurteilung der Unterschiede zweier Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des t-Testes. Die Regressionsgeraden wurden mit der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung berechnet (25).

3 Ergebnisse *

31 Perfusionen des distalen Tubulus mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen (Tab.1)

Kontrollen

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, ergibt die transtubuläre PD bei Durchströmung des distalen Tubulus mit 150 mM Kaliumlösung vom proximalen Tubulus her einen Wert von 46,9 mV. Dieser Wert entspricht der transtubulären PD unter Freifluß-Bedingungen. Ähnliche Werte wurden von anderen Autoren sowohl bei Freifluß-Bedingungen als auch bei Perfusion mit 150 mM Kalium (12,44) gefunden. Bei Wechsel der Perfusionslösung auf 1,5 mM Kalium beträgt die transtubuläre PD 6 mV (Lumen positiv). D.h., daß die transtubuläre PD sich bei Änderung der intratubulären Kaliumkonzentration um den Faktor 100 um 52,9 mV ändert. Die schematische Darstellung der Meßergebnisse ist in Abb.12 a und b angegeben. Von GIEBISCH et al. (12, s.a.Abb.15) werden ähnliche Werte bei Änderung der intratubulären Kaliumkonzentration angegeben.

Adrenalektomierte Tiere

Bei Durchströmung des distalen Tubulus mit 150 mM Kalium ist die transtubuläre PD gegenüber Kontrollen signifikant ($P < 0,001$) auf 35,1 mV reduziert. Auch dieser Wert entspricht den unter Freifluß gemessenen Werten. In einer früheren Arbeit (16) konnte keine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung zwischen den an Kontrollratten und adrenalektomierten Ratten gemessenen PD festgestellt werden.

Neben der Verminderung der transtubulären PD fällt bei adrenalektomierten Ratten weiter auf, daß bei Änderung der intraluminalen Kaliumkonzentration auf 1,5 mM die Änderung der Potentialdifferenz (Δ PD) gegenüber Kontrollen auf 32,5 mV reduziert ist. Dies ist auch ersichtlich an der

* -----
Signifikanzberechnungen befinden sich in Tab.5

geringeren Steilheit der Geraden, wenn man PD gegen die Konzentration der Perfusionslösungen aufträgt (Abb. 8). Das bedeutet, daß die luminale Membran adrenaletomierter Ratten bei gleicher Änderung der intratubulären Kaliumkonzentration wie bei Kontrollen mit einer geringeren Änderung der Potentialdifferenz reagiert.

Adrenaletomierte Tiere + Aldosteron i.v.

Adrenaletomierten Ratten wurde 1 1/2 Stunden vor Versuchsbeginn Aldosteron i.v. injiziert.

Die 2-4 Stunden nach der Verabreichung von Aldosteron durchgeführten Messungen zeigten, daß bei intraluminaler Perfusion mit 150 mM Kalium die transtubuläre PD nicht gegenüber adrenaletomierten Ratten verändert war, daß jedoch Δ PD mit 51,7 mV vollständig normalisiert wurde.

Adrenaletomierte Tiere + Aldosteron i.m.

Im Vergleich zu den intravenös mit Aldosteron substituierten adrenaletomierten Ratten erreichen die adrenaletomierten Tiere, denen Aldosteron in Öl gelöst intramuskulär verabreicht worden war, nicht in dem Maße eine Angleichung an die Kontrolltiere.

Ihre Δ PD beträgt nur 46,5 mV. Dieser Wert ist jedoch signifikant erhöht gegenüber adrenaletomierten Tieren ($P < 0,001$).

Es ist anzunehmen, daß die Resorption der öligen Aldosteronlösung unvollständig und ungleich erfolgte, so daß sich zur Zeit der Experimente Aldosteron nicht in ausreichender Menge im Blut befand. Weiterhin ist zu dem in Öl gelösten Aldosteron zu sagen, daß es sich zum Zeitpunkt des Versuchs um eine 7 Jahre alte Charge handelte, so daß die Aktivität zumindest in Frage gestellt werden muß.

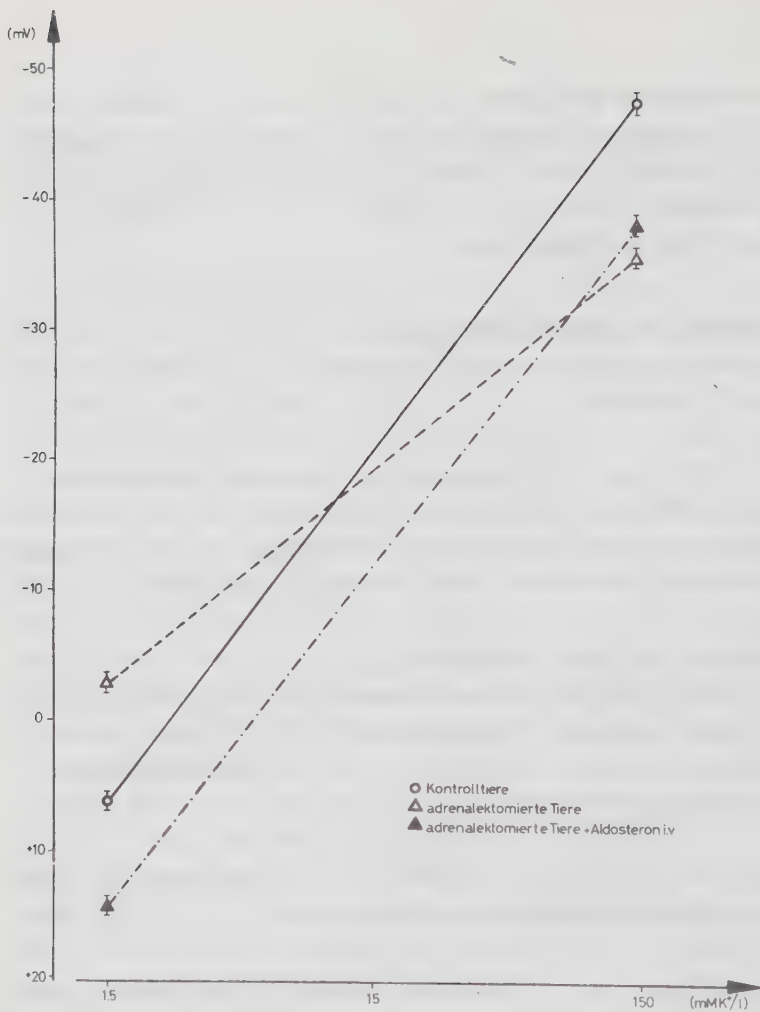


Abb. 8 : Transtubuläre PD von drei Versuchsgruppen am distalen Tubulus bei Kaliumperfusion.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.

Einer Gruppe von adrenalektomierten Tieren wurde gleichzeitig mit dem Aldosteron Cycloheximid i.v. gegeben, und zwar in einer Dosierung, die zu einer weitgehenden Hemmung der Proteinsynthese bei Ratten führt (28).

Mit Hilfe dieser Gruppe sollte geprüft werden, ob die Permeabilitätsveränderung Proteinsynthese-abhängig ist.

Dabei fanden wir, daß Cycloheximid in der verwandten Dosis den Effekt von Aldosteron auf die Änderung der PD bei intratubulärer Änderung der Kaliumkonzentration im distalen Tubulus in unseren Versuchen nicht beeinflussen konnte.

Die Versuche wurden 1-4 Stunden nach intravenöser Injektion von Aldosteron und Cycloheximid durchgeführt.

Kontrolltiere + Cycloheximid i.a.

Eine Bestätigung dieser Ergebnisse zeigte sich in Untersuchungen an Kontrolltieren, denen Cycloheximid in die Nierenarterie gegeben worden war.

Gegenüber den Kontrolltieren ohne Cycloheximid ergaben sich 2-4 Stunden nach Cycloheximidgabe keine Unterschiede in den Potentialdifferenzen.

Hierbei muß berücksichtigt werden, daß eine ungleiche Verteilung des in die Nierenarterie injizierten Pharmakons diskutiert wird (14).

Kontrolltiere + Actinomycin D i.v.

Auch Untersuchungen an Kontrolltieren, denen ein Proteinsynthesehemmer in Form des Actinomycins D gegeben wurde, zeigten sich in ihrer PD

unbeeinflußt. - Actinomycin D hemmt jedoch an der isolierten Membran (4) und an der Rattenniere (6,16,36) den aktiven Na-Transport.

32 Perfusion des proximalen Tubulus mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen (Tab.2)

Die proximalen PD der Tab.2 und der Abb.9 zeigen grundsätzlich die gleichen Abhängigkeiten bezüglich ihrer Änderung der PD bei Änderung der intraluminalen Kaliumkonzentration wie die distalen Daten.

Auch hier ist die Abnahme von Δ PD in der Nebenniereninsuffizienz zu sehen. Gibt man adrenaletomierten Tieren Aldosteron, so normalisieren sich die proximalen PD und erreichen den Wert der Kontrolltiere.

Ebenso wie am distalen Tubulus sind Cycloheximid und Actinomycin D in den verabreichten Dosen nicht in der Lage, den Effekt von Aldosteron am proximalen Tubulus zu hemmen. Insgesamt lagen die am proximalen Tubulus gefundenen PD unter den PD, wie sie am distalen Tubulus gemessen wurden.

33 Perfusion des distalen Tubulus mit verschiedenen Natriumkonzentrationen (Tab.3)

Kontrollen. Bei Perfusion des distalen Tubulus mit 150 mM Natrium ergibt sich eine transtubuläre PD von 38,6 mV (Tab.3 u. Abb.10). Die transtubuläre PD bei Perfusion mit Natrium liegt somit um 8,3 mV niedriger als bei Perfusion mit 150 mM Kalium.

Dieser Befund zeigt, daß die luminale Membran - zumindest bei luminaler Perfusion mit großen Elektrolytkonzentrationen - relativ permeabler ist für Kalium als für Natrium.

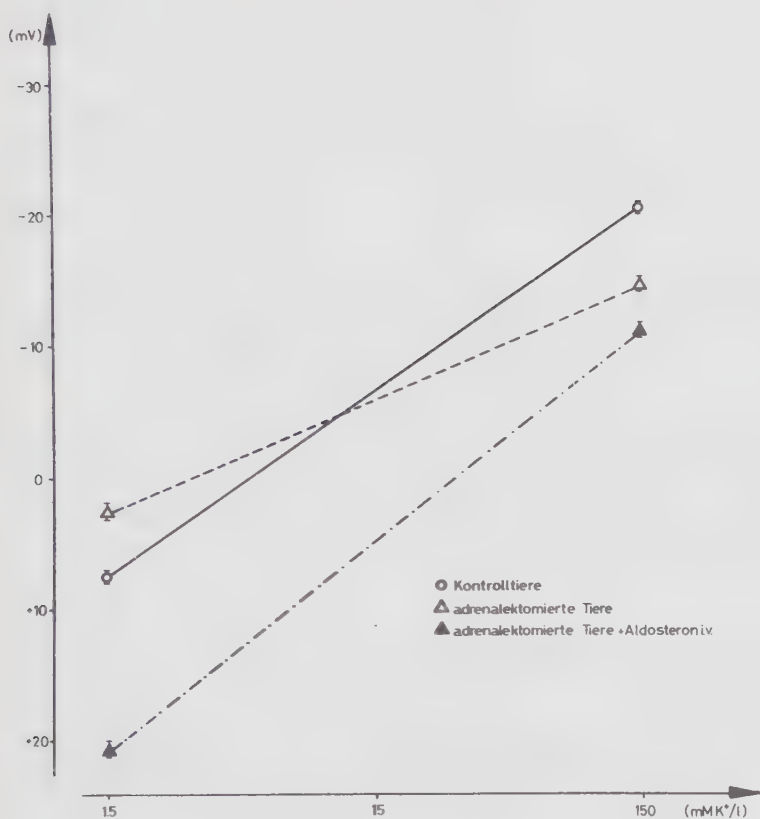


Abb. 9 : Transtubuläre PD von drei Versuchsgruppen am proximalen Tubulus bei Kaliumperfusion.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.

Aus der Abb.10 ist ersichtlich, daß Aldosteron akut die bei Adrenalektomie erniedrigten transtubulären Potentialdifferenzen erhöht, jedoch nicht normalisiert. Die Steigung der Geraden (Δ PD) liegt mit 32 mV pro 100facher Änderung der intratubulären Natriumkonzentration signifikant ($P < 0,001$) höher als bei adrenalektomierten Tieren ohne Aldosteron und ebenfalls höher als bei Kontrollratten.

Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v. v

Wurde Cycloheximid gleichzeitig mit Aldosteron verabreicht, so konnte auch nach einer Beobachtungszeit von 2-4 Stunden der Effekt von Aldosteron auf Δ PD durch Cycloheximid nicht gehemmt werden.

Kontrolltiere + Aldosteron i.v.

In 104 Einzelmessungen an 3 Ratten (Tab.3) wurde der Effekt von akuter Verabreichung von Aldosteron untersucht. Δ PD wurde bei Kontrollratten durch Aldosteron nicht gesteigert.

34 Perfusion des proximalen Tubulus mit verschiedenen Natrium-Konzentrationen (Tab.4)

Wie im distalen Tubulus war im proximalen Tubulus zwischen Kontrollen und adrenalektomierten Tieren kein Unterschied in der Änderung der transtubulären Potentialdifferenz bei 100facher Änderung der intratubulären Natriumkonzentration.

Im Gegensatz zum distalen Tubulus jedoch führte akute Verabreichung von Aldosteron nicht nur bei adrenalektomierten Tieren, sondern auch bei Kontrolltieren zu einer Erhöhung von Δ PD.

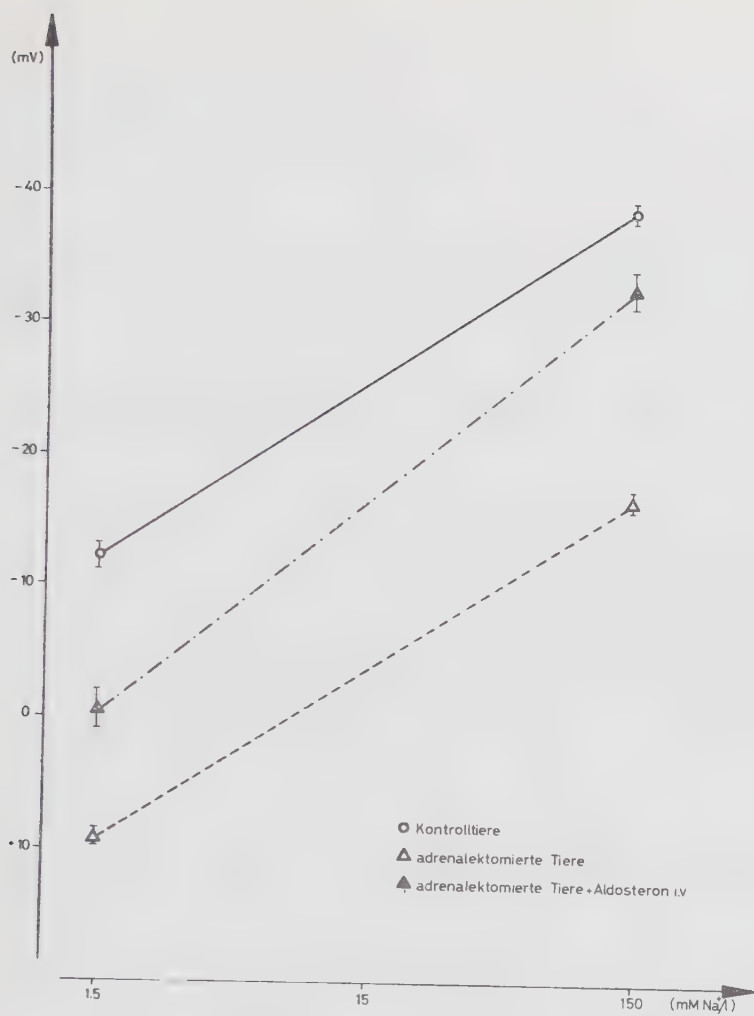


Abb 10 : Geradendarstellung der mit Natrium perfundierten distalen Tubuluspotentiale.

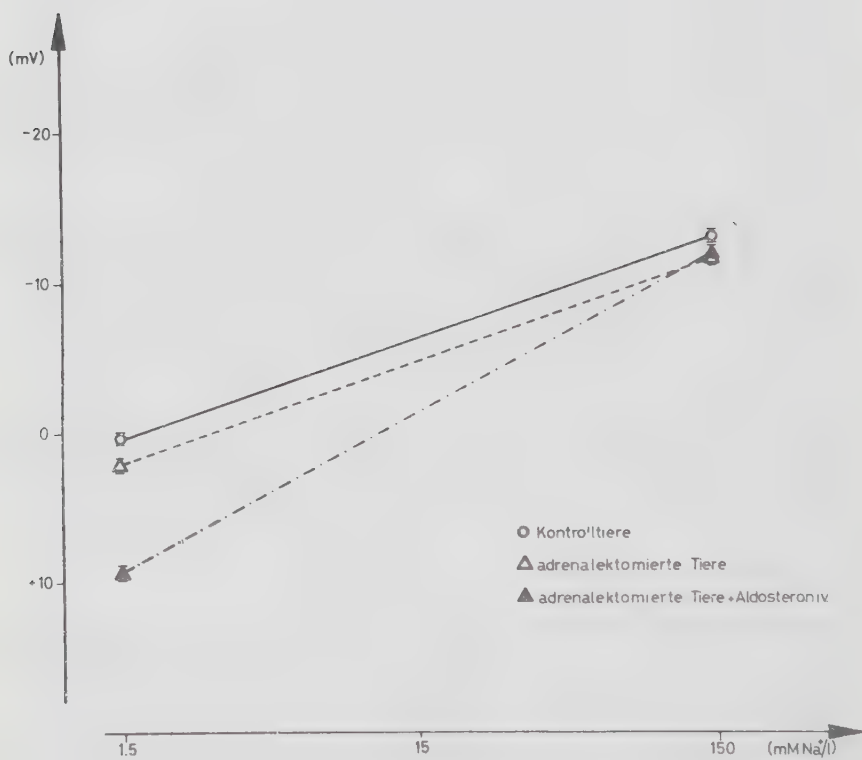


Abb. 11 : Geradendarstellung der mit Natrium perfundierten proximalen Tubuluspotentiale.

35 Peritubuläres Membranpotential (Tab. 6)

Distaler Tubulus

In 40 Einzelmessungen an 5 Kontrollratten ergab sich ein peritubuläres Membranpotential von $75,4 \pm 1,6$ mV.

Wie die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte (Abb.12) ergibt, liegen die Werte bei Kontrolltieren symmetrisch um den Mittelwert. Es wurden nur die Werte verwandt, bei denen das MP in 1 sec um nicht mehr als 10% abfiel und bei denen der Spitzenwiderstand anstieg (s. Abb. 7). Eine weitere Auswahl wurde nicht getroffen, insbesondere wurden auch keine niedrigen Werte eliminiert.

Registrierungen des peritubulären Membranpotentials über einen Zeitraum von einer oder mehr Sekunden sind für den distalen Tubulus in der Literatur bisher nicht angegeben. Von GIEBISCH et al. (12) und WRIGHT (44) wurden die bei der Punktion distaler Tubuli transient auftretenden Spitzenpotentiale als peritubuläre Membranpotentiale interpretiert. Die dort angegebenen Mittelwerte von 75 bzw. 71 mV entsprechen dem in Tab.6 angegebenen Mittelwert.

Ob die Streuung der Einzelwerte zwischen 60 und 100 mV einer normalen Variation des peritubulären Membranpotentials entspricht oder ob einzelne Werte artifiziell verändert wurden, läßt sich nicht eindeutig aussagen.

Kürzlich wurden von KHURI et al. (18) peritubuläre Membranpotentiale, jedoch auch nur kurzzeitige, von im Mittel $67,4$ mV veröffentlicht.

In der Nebenniereninsuffizienz ist das peritubuläre Membranpotential signifikant ($P < 0,001$) auf $62,3 \pm 1,6$ mV erniedrigt. 2-4 Stunden nach

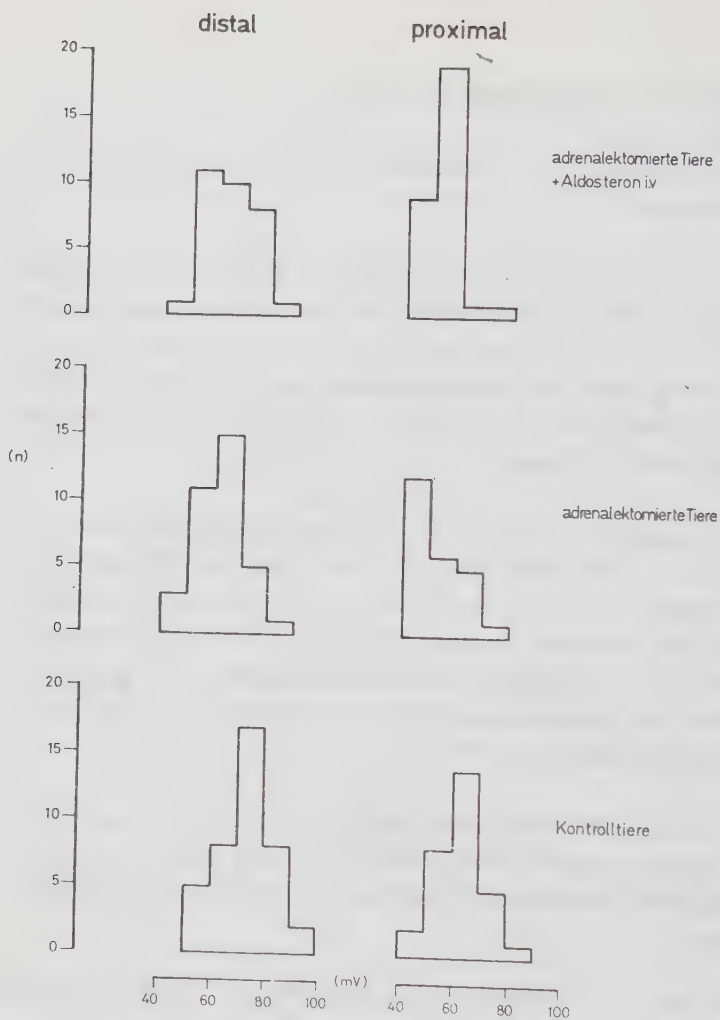


Abb. 12 : Häufigkeitsverteilung der peritubulären Membranpotentiale.

Verabreichung von Aldosteron wurde das Membranpotential nicht signifikant ($0,15 > P > 0,10$) beeinflusst.

Proximaler Tubulus

Das im proximalen Tubulus registrierte peritubuläre Membranpotential (Tab. 6 und Abb.12) war um etwa 10 mV niedriger als in der distalen Tubuluszelle.

Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß es infolge der basalen Einfältelungen und des interzellulären shunts im proximalen Tubulus wesentlich schwieriger ist, stabile Membranpotentiale zu registrieren als im distalen Tubulus.

Wie die Abb. 7a jedoch zeigt, war es auch im proximalen Tubulus möglich, über mehrere Sekunden stabile Membranpotentiale zu registrieren. Bisher wurde ein stabiles Membranpotential lediglich von FRÖMTER und Mitarbeitern (9,35) für den proximalen Tubulus angegeben. Der Mittelwert liegt bei diesen Autoren mit 74 mV höher als der in Tab.6 angegebene Mittelwert, jedoch ist zu bemerken, daß von FRÖMTER und Mitarbeitern lediglich Werte über 65 mV berücksichtigt wurden.

Ebenso wie im distalen Tubulus ist auch im proximalen Tubulus das peritubuläre Membranpotential in der Nebennierenrindeninsuffizienz signifikant ($P < 0,001$) erniedrigt. Auch hier führt akute Verabreichung von Aldosteron nicht zu einem Anstieg des Membranpotentials.

Tabelle 1 : Transtubuläre Potentialdifferenzen am distalen Tubulus bei intratubulärer Perfusion mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen.

Versuchsgruppe	n	Perfusions- methode	transstubuläre PD* bei intratubuläre Perfusion mit 150 mM K ⁺ 15 mM K ⁺ 1,5 mM K ⁺	Δ PD (mV)		
Kontrollen	3	35 distal/ distal	-37,3 [±] 1,5 **	+ 6,0 [±] 2,6	43,3	
Kontrollen	9	111 proximal/ distal	-46,9 [±] 0,9	-	+ 6,0 [±] 0,9	52,9
Kontrollen	3	74 proximal/ distal	-47,5	- 7,8	-	39,7
Adrenalektomierte Tiere	7	102 proximal/ distal	-35,1 [±] 0,9	-	-2,6 [±] 0,8	32,5
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v.	5	113 proximal/ distal	-37,5 [±] 1,1	-	+14,2 [±] 1,1	51,7
Adrenalektomierte + Aldosteron i.m.	6	86 proximal/ distal	-37,0 [±] 1,2	-	+ 9,5 [±] 1,1	46,5
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	4	81 proximal/ distal	-44,5 [±] 1,0	-	+ 7,0 [±] 1,0	51,5
Kontrollen + Cycloheximid i.a.	3	68 proximal/ distal	-45,5	-	+ 4,7	50,2
Kontrollen + Actinomycin D i.v.	5	105 proximal/ distal	-39,6 [±] 0,8	-	+15,6 [±] 0,8	55,2

Mittelwerte der "free flow" PD : 46 mV bei Kontrolltieren

* Das Vorzeichen der PD bezieht sich immer auf Lumen gegenüber peritubulärer Flüssigkeit.

** Toleranzwerte = SE - Werte

Tabelle 2 : Transtubuläre Potentialdifferenzen am proximalen Tubulus bei intratubulärer Perfusion mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen

Versuchsgruppe	n	Perfusions- Ratten Messungen methode	transtubuläre PD* proximaler Tub. bei intratubulärer Perfusion mit 150 mM K ⁺ 15 mM K ⁺ 1,5 mM K ⁺	ΔPD (mV)
Kontrollen	7	113	proximal/ proximal	-20,6±0,5** - + 7,6±0,6 28,2
Kontrollen	3	55	proximal/ proximal	-19,4 + 1,9 - 21,3
Adrenalektomierte Tiere	4	80	proximal/ proximal	-14,5±0,5 - + 2,4±0,4 16,9
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v.	1	9	proximal/ proximal	-11,0±0,3 - +20,9±0,9 31,9
Adrenalektomierte + Aldosteron i.m.	7	82	proximal/ proximal	-22,3±0,7 - + 8,2±1,1 30,5
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	4	71	proximal/ proximal	-16,2±0,5 - +17,4±0,6 33,6
Kontrollen + Cycloheximid i.a.	1	12	proximal/ proximal	-17,1 - +14,0 31,1
Kontrollen + Actinomycin D i.v.	2	30	proximal/ proximal	-18,9±1,0 - +15,2±1,1 34,1
Mittelwert der "free flow" PD : 1 mV bei Kontrolltieren				

* Das Vorzeichen der PD bezieht sich immer auf Lumen gegenüber peritubulärer Flüssigkeit.

** Toleranzwerte = SE - Werte

Tabelle 3 : Transtubuläre Potentialdifferenzen am distalen Tubulus bei intratubulärer Perfusion mit verschiedenen Natriumkonzentrationen.

Versuchsgruppen	n	Perfusions- methode	trans tubuläre PD * bei intratubulärer Perfusion mit 150 mM Na ⁺	distaler Tubuli Perfusion mit 1,5 mM Na ⁺	ΔPD (mV)	
Kontrollen	7	157	proximal/ distal	-38,6 ± 0,6**	-12,3 ± 0,7	26,3
Adrenalektomierte Tiere	6	139	proximal/ distal	-16,3 ± 0,4	+ 9,2 ± 0,6	25,5
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v.	6	99	proximal/ distal	-32,4 ± 0,9	- 0,4 ± 1,3	32,0
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v. + Cycloheximide i.v.	4	82	proximal/ distal	-24,0 ± 1,1	+ 6,0 ± 1,0	30,0
Kontrollen + Aldosteron i.v.	3	104	proximal/ distal	-32,5 ± 0,8	- 5,2 ± 0,5	27,3 /

* Das Vorzeichen der PD bezieht sich auf Lumen
gegenüber peritubulärer Flüssigkeit.

** SE - Werte

Tabelle 4 : Transtubuläre Potentialdifferenz am proximalen Tubulus bei intratubulärer Perfusion mit verschiedener Natriumkonzentration.

Versuchsgruppe	n Ratten	Messungen	Perfusions- methode	transtubuläre PD bei intratubulärer Perfusion mit 150 mM Na ⁺	* proximaler Tub. Perfusion mit 1,5 mM Na ⁺	ΔPD (mV)
Kontrollen	7	163	proximal/ proximal	-12,7 ± 0,2	+ 0,3 ± 0,3	13,0
Adrenalektomierte Tiere	5	110	proximal/ proximal	-11,4 ± 0,3	+ 2,1 ± 0,4	13,5
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v.	6	74	proximal/ proximal	-11,7 ± 0,3	+ 9,3 ± 0,6	21,0
Adrenalektomierte + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	5	96	proximal/ proximal	- 9,3 ± 0,3	+ 6,8 ± 0,6	16,1
Kontrollen + Aldosteron i.v.	4	73	proximal/ proximal	-11,2 ± 0,44	+12,9 ± 0,4	24,1

* Das Vorzeichen der PD bezieht sich auf Lumen
gegenüber peritubulärer Flüssigkeit.

** SE - Werte

Tabelle 5 : Signifikanzberechnung

Versuchsgruppe	verglichen mit Versuchsgruppe	Signifikanz P
Kontrolltiere	adrenalektomierten Tieren	$P < 0,001$
adrenalektomierte Tiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$P < 0,001$
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$0,4 > P > 0,3$

Tabelle 5a : Signifikanzberechnung der distalen PD bei Kaliumperfusionslösungen

Versuchsgruppe	verglichen mit Versuchsgruppe	Signifikanz
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere	$P < 0,001$
adrenalektomierte Tiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$0,01 > P > 0,005$
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$0,05 > P > 0,025$

Tabelle 5b : Signifikanzberechnung der proximalen PD bei Kaliumperfusionslösungen

Versuchsgruppe	verglichen mit Versuchsgruppe	Signifikanz
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere	$0,4 > P > 0,3$
adrenalektomierte Tiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$P < 0,001$
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$P < 0,001$

Tabelle 5c : Signifikanzberechnung der distalen PD bei Natriumperfusionslösungen.

Versuchsgruppe	verglichen mit Versuchsgruppe	Signifikanz
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere	$0,5 > P > 0,3$
adrenalektomierte Tiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$P < 0,001$
Kontrolltiere	adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	$P < 0,001$

Tabelle 5d : Signifikanzen der proximalen PD bei Natriumperfusion

Tabelle 6 : Peritubuläres Membranpotential

Versuchsgruppe	Distaler Tubulus		Membranpotential
	n	Ratten Messungen	
Kontrolltiere	5	40	75,35 $\pm$ 1,56
Adrenalektomierte Tiere	3	35	62,34 $\pm$ 1,62
Adrenalektomierte Tiere	2	31	65,19 $\pm$ 1,61
+ Aldosteron i.v.			

Versuchsgruppe	Proximaler Tubulus		Membranpotential
	n	Ratten Messungen	
Kontrolltiere	5	29	64,74 $\pm$ 1,45
Adrenalektomierte Tiere	3	24	54,25 $\pm$ 2,00
Adrenalektomierte Tiere	3	30	54,83 $\pm$ 1,06
+ Aldosteron i.v.			

4 Diskussion

4.1 Methoden

Von HODGKIN und HOROWICZ (17) wurde erstmals an Muskelzellen die Methode verwandt, durch Änderung der Ionenkonzentration an einer Membran und der daraus resultierenden PD einen Anhalt über die relative Leitfähigkeit der Membran für einzelne Ionen zu bekommen. Diese Methode wurde von GIEBISCH und Mitarbeitern (12) auf die Niere übertragen.

Im folgenden Abschnitt soll dargestellt werden, wie man aus der Messung von transepithelialen PD Rückschlüsse auf die beteiligten Einzelmembranen machen kann, und wie sich im Weiteren daraus Permeabilitätsverhältnisse ableiten lassen.

Die Abbildungen 13 a - d zeigen schematisch die gemessenen und berechneten PD am distalen Tubulus bei Durchströmung des Lumens mit unterschiedlichen Natrium- und Kaliumlösungen.

In der Abbildung 13 a wurden flammenphotometrisch gemessene Plasmakaliumkonzentrationen von Kontrolltieren und eine intrazelluläre Kaliumkonzentration von 150 mM eingesetzt.

Die transtubuläre PD von 47 mV ist der Mittelwert von Kontrollratten (s. Tab. 1).

Das peritubuläre Membranpotential von 75 mV entspricht dem Mittelwert der eigenen Messungen (s. Tab. 6) bei Kontrolltieren. Die luminale PD errechnet sich aus der Differenz zwischen peritubulärem und transtubulärem Potential.

Intraluminal wurde die Perfusionslösung von 150 mM K^+ eingesetzt.

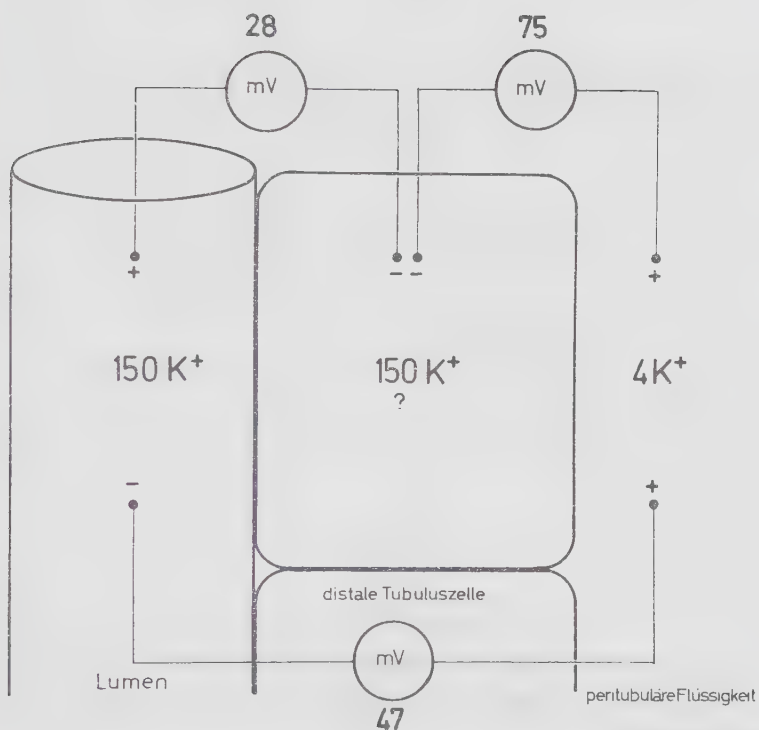


Abb. 13a : Schematische Darstellung der PD bei intraluminarer Kaliumkonzentration von 150 mM.

Grundsätzlich ist das Membranpotential einer Zelle vorwiegend durch das Verhältnis der Permeabilitäten von Natrium-, Kalium- und Chlorid- ionen und deren intra- und extrazellulären Konzentrationen bestimmt.

Nach der Goldman-Gleichung läßt sich, - bei bekannten Ionenarten, deren Permeabilitätsverhältnisse und deren Konzentrationen - , das daraus resultierende Membranpotential (in mV) berechnen:

$$E = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \log \frac{PK (K)_i + PNa (Na)_i + PCl (Cl)_a}{PK (K)_a + PNa (Na)_a + PCl (Cl)_i}$$

E = elektrische Potentialdifferenz

R = allgemeine Gaskonstante

T = Temperatur ($^{\circ}K$)

F = Faraday-Konstante

P = Permeabilität

() = Konzentration

i = innen

a = außen

Wird nun ein Membranpotential als hauptsächlich von einer Ionenart abhängig postuliert, so geht die Goldman-Gleichung in die Nernst'sche Gleichung über.

Das Membranpotential an der peritubulären Zellseite ist vorwiegend ein Kaliumdiffusionspotential (GIEBISCH et al. (11)).

Bei $PK \gg PNa, PCl$ ist

$$E_K = - \frac{R \cdot T}{F} \cdot \log \frac{(K)_i}{(K)_a}$$

Nach der Nernst'schen Gleichung beträgt das Potential an der peritubulären Membran:

$$E_K = - 61 \cdot \log \frac{150}{4} = - 96 \text{ mV}$$

Man mißt jedoch einen realen Wert von 75 mV. Das zeigt, daß der Anteil der übrigen Ionen an dieser Membranpotentialbildung bei der Berechnung vernachlässigt werden kann. Die kritische Größe bei dieser Berechnung ist die intrazelluläre Kaliumkonzentration. Die Aktivität von Kalium in der Zelle ist nicht bekannt. Von KHURI et al. (18) wird aufgrund von Messungen mit K-sensitiven Elektroden neuerdings eine erheblich niedrigere intrazelluläre K-Aktivität als 150 mM postuliert.

Wird das Tubuluslumen mit einer 150 mM K^+ Lösung perfundiert, sollte sich an der luminalen Membran der Tubuluszelle kein Potential ausbilden, - vorausgesetzt, es handelt sich hier hauptsächlich um ein Kaliumdiffusionspotential - , denn

$$E_K = - 61 \cdot \log \frac{150}{150} ; E_K = 0$$

Eine in das Tubuluslumen gebrachte Elektrode würde dann die PD zwischen peritubulärem und luminalem Membranpotential messen. Dieser Meßwert läge theoretisch bei ca. 75 mV (intraluminal negativ), wenn auch das luminale Membranpotential ein Kaliumdiffusionspotential wäre.

Gemessen wird aber nur ein distaler Wert von $PD = 47 \text{ mV}$. Nimmt man an, daß das peritubuläre Membranpotential bei 75 mV liegt, so errechnet sich für die luminale Membran des distalen Tubulus ein Wert von 28 mV. ($PD_{\text{transtub.}} = P_{\text{lum.}} - P_{\text{peritub.}}$).

Dies ist ein Beweis dafür, daß Kaliumionen allein nicht ausschlaggebend

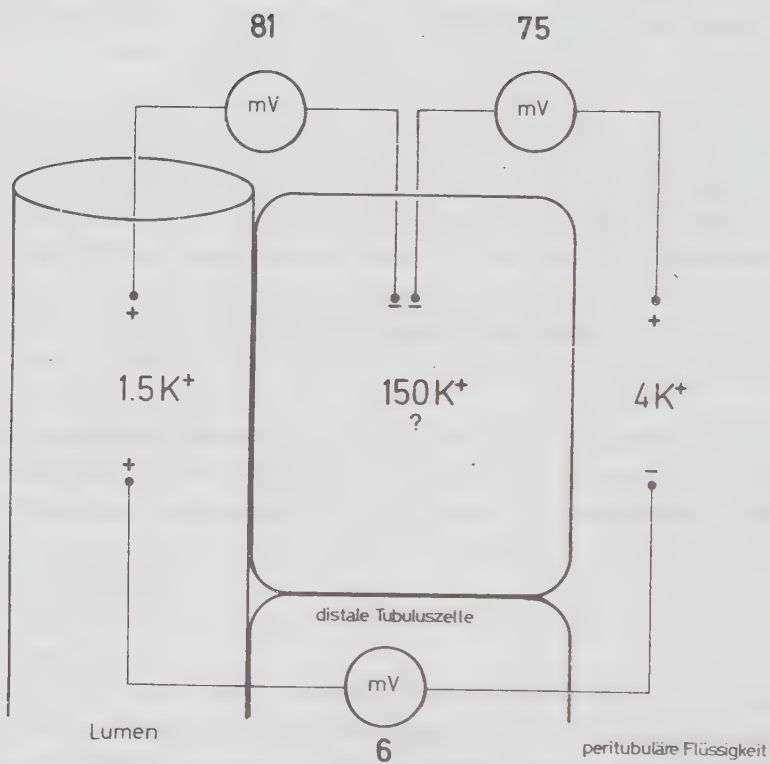


Abb. 13b : Schematische Darstellung der PD bei intraluminaler Kaliumkonzentration von 1,5 mM.

für das luminale Membranpotential sind.

Da sich nur an der luminalen Membran aufgrund des Kaliumkonzentrationsunterschiedes das Potential ändert,

$$E_K = - 61 \cdot \log \frac{150}{1,5} \approx - 122 \text{ mV}$$

wäre für die transtubuläre PD ein Wert von ca. 47 mV zu erwarten, wobei der intraluminale Pol positiv ist.

Man mißt aber nur einen distalen Wert von 6 mV (Lumen positiv).

Unter derselben Voraussetzung wie oben -, konstantes peritubuläres Membranpotential -, ergäbe sich aus der Messung für die distale luminale Membran ein Potential von 81 mV. Auch für diesen Fall wären also noch andere Ionen an der Bildung des Membranpotentials beteiligt.

GIEBISCH et al. (11) haben gezeigt, daß sich die luminale Tubuluszellmembran bezüglich ihrer Permeabilitäten für Kalium-, Natrium- und Chloridionen anders verhält, als die peritubuläre Membran.

Liegt die Ursache für das Potential auf der peritubulären Seite hauptsächlich bei den Kaliumionen, so ist die Beteiligung von Kalium-, Natrium- und Chloridionen an der luminalen Seite wesentlich ausgewogener. Dabei ergibt sich folgende Abstufung:

$$P_K > P_{Na} > P_{Cl}$$

Da das luminale Membranpotential u.a. abhängig ist von der Kaliumionenpermeabilität dieser Membran und der luminalen und intrazellulären Ka-

liumkonzentration, ergibt die transtubuläre PD-Messung einen Anhalt für die Permeabilitätsverhältnisse von Kalium an der luminalen Membran. Hierbei wird angenommen, daß sich bei luminaler Perfusion das peritubuläre Membranpotential nicht ändert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden anstelle von Kaliumperfusionslösungen Natriumperfusionslösungen benutzt.

Grundsätzlich lassen sich die Betrachtungen für Natriumionen in derselben Weise anstellen, wie für Kaliumionen. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Beteiligung der Natriumionen an der luminalen Membranpotentialbildung geringer ist, als die der Kaliumionen (11).

Für die Durchströmung des Tubulus mit 150 mM Na⁺ ergäbe sich unter der Annahme einer selektiv Natrium-permeablen Membran für das luminale Membranpotential ein errechneter Wert von:

$$E_{Na} = - 61 \cdot \log \frac{15}{150} , E_{Na} = + 61 \text{ mV}$$

(Potentialumkehrung aufgrund der Konzentrationsumkehrung)

In der Rechnung wurde eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 15 mM eingesetzt.

Die transtubuläre PD wäre 136 mV (Lumen negativ), wenn das luminale Membranpotential ein reines Natriumdifusionspotential wäre.

Im Experiment findet man aber eine distale PD von 38 mV (Lumen negativ). Der daraus berechnete Wert für das luminale Membranpotential (peritubulär konstant) läge dann bei 37 mV (Lumen positiv gegenüber intrazellulär) .

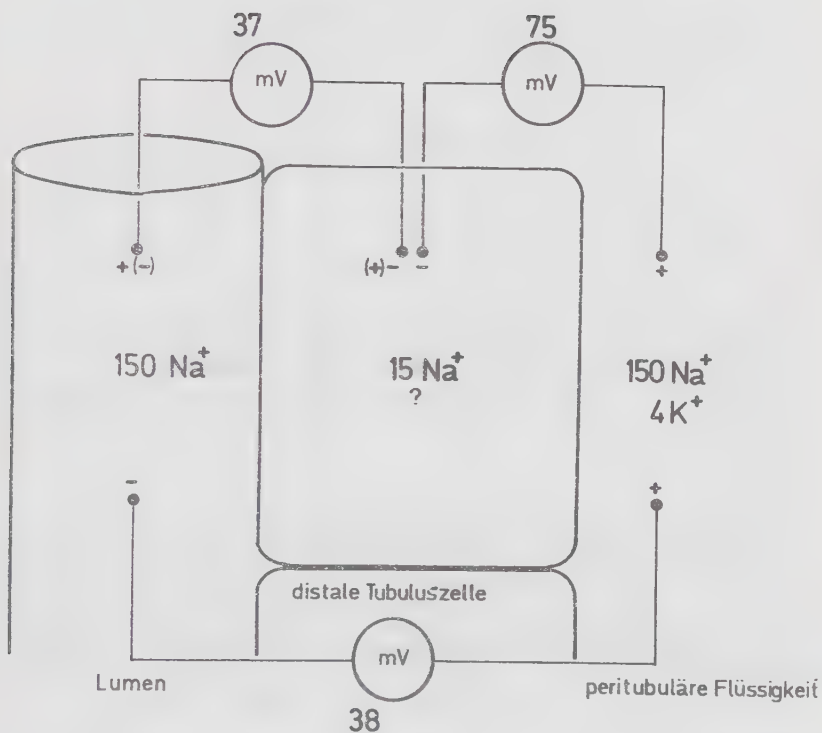


Abb. 13c: Schematische Darstellung bei luminaler Perfusion mit 150 mM Na.

Das heißt also, daß die luminale Membran der distalen Tubuluszelle eine etwas größere Selektivität für Kalium als für Natrium besitzt.

Bei dem Perfusionswechsel von 150 mM Na⁺ auf 1,5 mM Na⁺ stellen sich die Potentiale so dar:

$$E_{Na} = - 61 \cdot \log \frac{15}{1,5} ;$$

$$E_{Na} = - 61 \text{ mV}$$

Die PD wäre dann - 14 mV (Lumen negativ). Das Experiment gibt den distalen Wert der PD mit - 12 mV an (Lumen negativ).

Diese Befunde ergeben für das distale luminale Membranpotential einen Wert von - 63 mV.

Diese Betrachtungen über die Potentialentstehung an den einzelnen Membranen der Tubuluszelle und der daraus resultierenden transtubulären PD mit der Diskrepanz zwischen theoretisch errechneten und experimentell gefundenen Werten gelten, - wie bei den distalen, - ebenso bei den proximalen Tubuluszellen. Die transtubulären PD am proximalen Tubulus sind nur niedriger gegenüber den distalen Werten.

Trägt man nun die gemessenen PD gegen die Konzentrationen der Perfusionslösungen auf (Abb. 8), so ergeben die Steigungen der Geraden bzw. der Δ PD einen Anhalt für die Durchlässigkeit der Membran für die betreffende Ionenart.

An Hand der Ergebnisse ist zu erkennen, daß die Ausgangs- und Endwerte der Δ PD der einzelnen Gruppen und die Steilheit der Geraden unterschied-

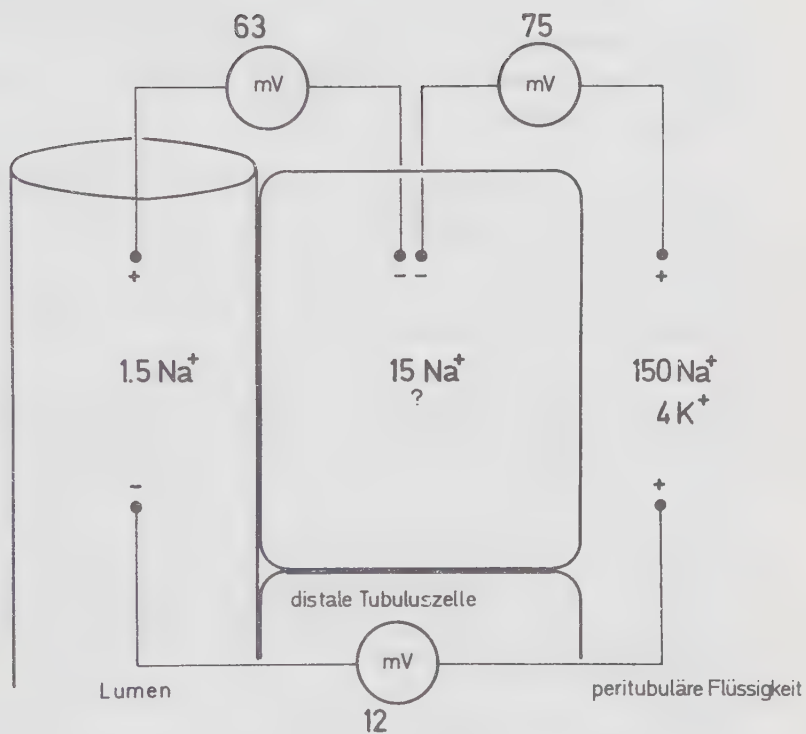


Abb. 13d : Schematische Darstellung bei luminaler Perfusion mit 1,5 mM Na.

lich sind.

Um auszuschließen, daß die Steilheit einer dieser Geraden von ihren PD-Ausgangswerten abhängig ist, wurden die Werte bei Kontrollen oberhalb und unterhalb des Mittelwertes zusammengefaßt. In der Abb. 14 ist zu erkennen, daß die Geraden parallel zueinander und zur gemeinsamen Geraden (Abb.8) verlaufen.

Weiterhin wäre zu untersuchen, ob es zulässig ist, eine lineare Beziehung zwischen Perfusionskonzentration und PD aufzustellen.

Dazu wurde in einer Meßreihe proximale und distale Tubuli mit 15 mM K^+ perfundiert (Werte siehe Tab.1 und 2).

Trägt man die verschiedenen Perfusionskonzentrationen logarithmisch gegen die gefundenen PD-Werte auf (Abb.15), so stellt sich heraus, daß alle drei Wertepaare nur angenähert auf einer Geraden liegen.

Zum Vergleich wurden Werte von GIEBISCH et al. (12) eingezeichnet, die einen ähnlichen Verlauf zeigen (gestrichelte Kurve). Trotz der Abweichung wurde der Bereich von 1,5 bis 150 mM für die Berechnung der Transportnummer eingesetzt.

42 Berechnung der relativen Permeabilität

Der Anteil eines Ions am Transport einer Elektrizitätsmenge ist abhängig von seiner Diffusionsgeschwindigkeit. Diese Leitfähigkeit, - Elektrizitätsmengen entsprechend seiner Geschwindigkeit zu transportieren, - ist nicht aus der molaren Leitfähigkeit abzulesen, da hiermit nur ein summarisches Maß für alle am Transport beteiligten Ionen unterschiedlicher Geschwindigkeit geschaffen ist. Daher wurde die Größe

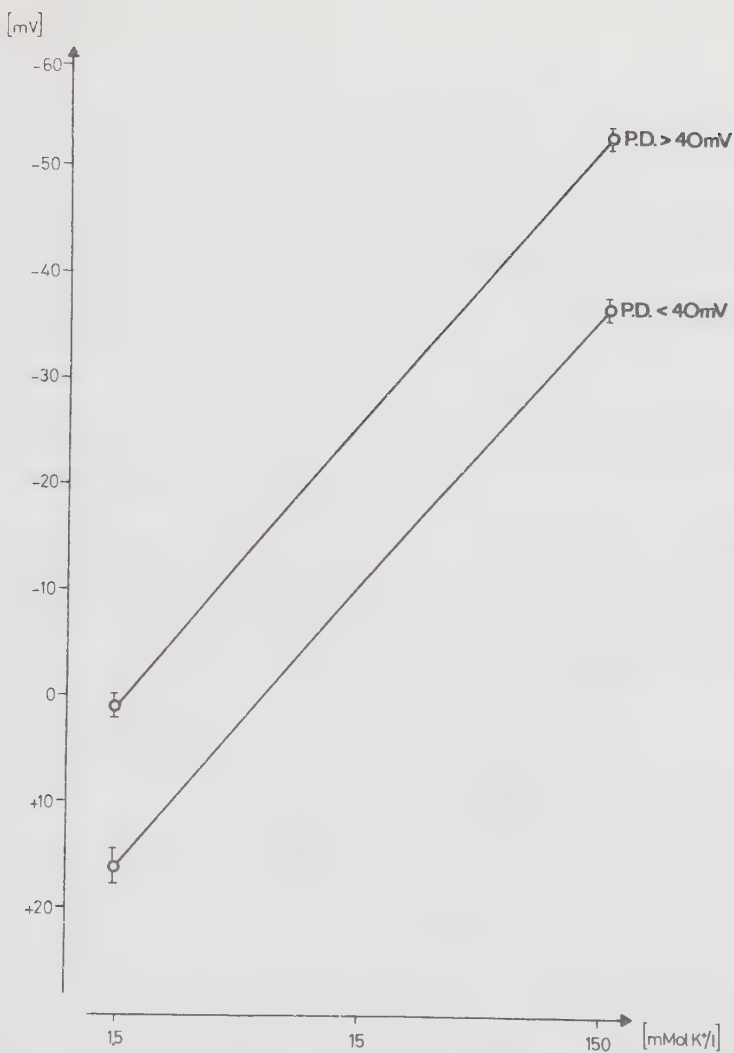


Abb. 14 : Transtubuläre PD von Kontrolltieren unterhalb und oberhalb des Mittelwertes.



Abb. 15 : Darstellung der Abhängigkeit zwischen intraluminaler Kaliumkonzentration und transtubulärer PD.

der Transportnummer (Überföhrungszahl nach HITTORF = transference number - transport number = T) eingeföhrt (24). Sie beschreibt, in wieweit ein Ion an der transportierten Elektrizitätsmenge aufgrund seiner Diffusionsgeschwindigkeit beteiligt ist. Sie sagt weiter aus, in wieweit eine Ionenart an der Bildung eines Potentials teilnimmt, bzw. wieviel von dem Gesamtstrom durch eine Membran von einer bestimmten Ionenart getragen wird.

Weiterhin beschreibt die Transportnummer die Ionenverhältnisse an einer feinporigen Membran, da sie z.B. die Undurchlässigkeit einer Membran für ein bestimmtes Ion erfaßt (24).

Nach HODGKINS und HOROWICZ (17) verhalten sich die Transportnummern einzelner Ionen wie ihre Leitfähigkeiten, bzw. wie ihre Permeabilitäten zueinander. (Die Einzelleitfähigkeit eines Ions errechnet sich aus dem Produkt seiner Transportnummer und der Gesamtleitfähigkeit).

Für die Experimente dieser Arbeit bedeutet das:

$$\frac{T_{Na}}{T_K} \sim \frac{g_{Na}}{g_K} \sim \frac{P_{Na}}{P_K}$$

T = Transportnummer
g = Leitfähigkeit
P = Permeabilität
Na = Natrium
K = Kalium

Dabei wurden keine quantitativen Messungen der Ionenmengen angestellt. Die Permeabilität P, - definiert als Quotient aus elektrischer Beweglichkeit mal Verteilungskoeffizient und Membrandicke, - ist deshalb hier als relative Permeabilität $\frac{P_1}{P_2}$ verstanden und beinhaltet vorwiegend

Tabelle 7a : Transportnummern nach Kaliumperfusion

Versuchsgruppe	T_K	T_K
	distal	proximal
Kontrolltiere	0,43	0,23
Adrenalektomierte Tiere	0,27	0,14
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.m.	0,38	0,25
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	0,42	0,26
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	0,42	0,27
Kontrolltiere + Actinomycin D i.v.	0,45	0,28

Tabelle 7b : Transportnummern nach Natriumperfusion

Versuchsgruppe	T_{Na}	T_{Na}
	distal	proximal
Kontrolltiere	0,22	0,11
Adrenalektomierte Tiere	0,21	0,11
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	0,27	0,17
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	0,25	0,13
Kontrolltiere + Aldosteron i.v.	0,27	0,20

Tabelle 7c : Relative Permeabilitäten

Versuchsgruppe	$\frac{T_K}{T_{Na}}$	$\frac{T_K}{T_{Na}}$
	distal	proximal
Kontrolltiere	1,95	2,09
Adrenalektomierte Tiere	1,28	1,27
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v.	1,56	1,53
Adrenalektomierte Tiere + Aldosteron i.v. + Cycloheximid i.v.	1,68	2,08

die passiven Durchlässigkeitseigenschaften der Membran, da die Messung der Transportnummer unabhängig von aktiven Transportprozessen ist (9).

Da in den hier beschriebenen Versuchen nur die intratubulären Konzentrationen variiert wurden und man davon ausgehen kann, daß während dieser Zeit die intrazelluläre Elektrolytkonzentrationen konstant bleiben, beziehen sich die relativen Permeabilitäten nur auf die luminale Membran. Die in Tab.7 dargestellten Transportnummern geben die Beteiligung der Kaliumionen am Membranpotential an und berechnen sich als Quotienten aus experimentell gefundenen Δ PD-Werten und den aufgrund des Konzentrationsverhältnisses berechneten theoretischen Werten:

$$\Delta \text{PD}_{\text{theor.}} = - \frac{R \cdot T}{F} \ln \frac{c_1}{c_2} ;$$

$$T = \frac{\Delta \text{PD}_{\text{exp.}}}{\Delta \text{PD}_{\text{theor.}}}$$

43 Kaliumtransport im distalen Tubulus

In Clearance- und Mikropunktionsuntersuchungen (11,21) wurde gezeigt, daß der distale Tubulus bei der Ratte fast ausschließlich verantwortlich ist für die im Endurin auftretenden Kaliumkonzentrationen und -Mengen. Der Kaliumtransport im distalen Tubulus ist abhängig 1. von der Potentialdifferenz an der luminalen Zellmembran, 2. von der Durchlässigkeit der luminalen Membran für Kalium, 3. von den Konzentrationsverhältnissen für Kalium an dieser Membran und 4. von der Na-K-Pumpe an der peritubulären Zellmembran.

Da die intrazelluläre Aktivität von Kalium zur Zeit noch nicht meßbar ist, wurde der Begriff des intrazellulären "pools" (20,39) verwandt.

Wie kürzlich am distalen Tubulus der Amphibienniere (39) und am distalen Tubulus der Rattenniere (GIEBISCH, pers.Mittlg.) gezeigt werden konnte, ist die Aktivität der Na-K-Pumpe an der peritubulären Zellmembran ausschlaggebend für den intrazellulären Pool und damit für die Sekretion von Kalium in das Tubuluslumen von großer Bedeutung.

Eine 5. Komponente für den distalen Kaliumtransport, der Einfluß der Na-Ionen auf den Kaliumtransport, soll hier nicht diskutiert werden, da das intratubuläre Angebot von Na-Ionen bei Perfusion mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen immer gleich 0 war, abgesehen vom einströmenden Na, das bei allen Lösungen gleich war.

In der Nebennierenrindeninsuffizienz ist die Ausscheidung von Kalium durch die Niere vermindert. Obwohl die Nettoresorption von Kalium im proximalen Tubulus durch Aldosteron stimuliert werden kann (41), ist die prozentuale Kaliumresorption am Ende des proximalen Tubulus bei adrenaletomierten Ratten gegenüber Kontrollen unverändert (2,32). Die Kaliumausscheidungsstörung in der Nebennierenrindeninsuffizienz ist darauf zurückzuführen, daß im distalen Tubulus die intratubuläre Kaliumkonzentration nicht wie bei Kontrollratten ansteigen kann (16).

Weiter wurde gezeigt, daß die Netto-Sekretion von Kalium entlang des distalen Tubulus bei adrenaletomierten Ratten vermindert ist (2). Der Mechanismus dieser Kalium-Ausscheidungsstörung war bisher nicht bekannt.

Vergleicht man die mit elektrophysiologischen Methoden gewonnenen Daten (Tab.6) so fällt zunächst auf, daß das Membranpotential an der peritubulären Seite von 75 mV bei adrenaletomierten Ratten signifikant auf 62 mV erniedrigt ist.

Dieser Befund spricht dafür, daß der aktive Transportprozeß an der peritubulären Membran - die Na-K-Pumpe - bei Fehlen von Nebennierenrindenhormonen reduziert ist. Mit dieser Annahme ist vereinbar, daß die transtubuläre Netto-Resorption von Natrium im distalen Tubulus bei adrenaletomierten Ratten vermindert ist (15).

Da die Aktivität der peritubulär gelegenen Pumpe für die Größe des intrazellulären Kaliumpools von entscheidender Bedeutung ist (39), muß man annehmen, daß der intrazelluläre Pool für Kalium und damit die Sekretion von Kalium in das Tubuluslumen vermindert sind.

Der Begriff des Kalium-Pools beschreibt nicht die intrazelluläre Kaliumkonzentration, sondern beinhaltet die am Transportgeschehen beteiligte Menge eines Ions in der Zelle.

Betrachtet man die Verhältnisse an der luminalen Zellseite, so errechnet sich aus der Differenz zwischen peritubulären Membranpotentialen und transtubulären Potentialen ein Potential an der luminalen Membranseite bei Kontrolltieren von 28 mV und bei adrenaletomierten Ratten von 27 mV.

Diese Berechnung geht von der Voraussetzung aus, daß im distalen Tubulus kein interzellulärer Shunt vorhanden bzw. vernachlässigbar klein ist.

Die elektrisch treibende Kraft an der luminalen Membranseite für die Sekretion von Kalium wird somit in der Nebenniereninsuffizienz nicht verändert.

Das Verhältnis der Transportnummern für Kalium und Natrium bzw. deren relative Permeabilitäten entspricht bei Kontrollratten denen von anderen Autoren (11,12,44) gefundenen Meßergebnissen.

Danach ist die relative Permeabilität für Kalium an der luminalen Membran zwar größer als die relative Permeabilität für Natrium ($T_K/T_{Na} = 1,95$, s. Tab. 7 c), die luminale Membran besitzt jedoch keine ausgesprochene Selektivität für Kaliumionen.

Die Abnahme der Transportnummer von 0,43 bei Kontrolltieren auf 0,27 bei adrenaletomierten Tieren, und die Erniedrigung des Verhältnisses der relativen Permeabilität $T_K/T_{Na} = 1,28$ ist zurückzuführen auf eine Abnahme der relativen Kaliumpermeabilität der luminalen Zellmembran in der Nebennierenrindeninsuffizienz.

Akute Verabreichung von Aldosteron in einer Dosierung, die etwa im Bereich der endogenen Sekretionsrate dieses Hormons liegt (29) führte 2-4 Stunden nach Injektion nicht zu einer Veränderung des peritubulären Membranpotentials, obwohl Aldosteron den transtubulären Nettonatriumtransport im distalen Tubulus nach dieser Zeit normalisiert (40).

Es ist daher anzunehmen, daß die peritubuläre Na-K-Pumpe durch Aldosteron zwar akut aktiviert bzw. normalisiert wird, daß aber das peritubuläre Membranpotential hiervon nicht berührt wird. Denn dieses Potential, - abhängig von den Elektrolytverhältnissen an der peritubulären Membran - , wird erst dann seinen ursprünglichen Wert erreichen, wenn es zu einer Normalisierung der Elektrolytverhältnisse gekommen ist.

Aufgrund des unveränderten peritubulären Membranpotentials ist anzunehmen, daß die akute Wirkung von Aldosteron diese Verhältnisse nicht normalisiert und die intrazelluläre Kaliumkonzentration nicht beeinflusst.

Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, daß sich die extrazelluläre

Kaliumkonzentration nach akuter Aldosterongabe nicht verändert.

Es ist auch nicht anzunehmen, daß innerhalb dieser Zeit die Konzentrationsverhältnisse für Kalium an der luminalen Membran geändert werden. Das berechnete luminale Membranpotential der adrenalectomierten Tiere + Aldosteron i.v. gegenüber Kontrolltieren und adrenalectomierten Tieren ohne Aldosteron war unverändert. Die Normalisierung der Transportnummern ist nur mit einer akuten Zunahme der relativen Kaliumpermeabilität durch Aldosteron zu erklären.

Eine langdauernde Aldosteronverabreichung sollte über die Aktivierung der peritubulären Na- und K-Pumpe zu einer Erhöhung der intrazellulären Kaliumkonzentration und zu einer Auffüllung des intrazellulären K-Pools führen, wodurch der Anteil des Pools an der Kaliumsekretion wieder erhöht würde.

Zusammenfassend läßt sich sagen (Abb. 16), daß die verminderte Kaliumsekretion des distalen Tubulus in der Nebenniereninsuffizienz darauf zurückzuführen ist, daß die relative Kaliumpermeabilität an der luminalen Membran und die aktive Aufnahme von Kalium an der peritubulären Membran und damit die Auffüllung des intrazellulären Kaliumpools vermindert sind.

Die Stimulierung der Kaliumsekretion durch akute Verabreichung von Aldosteron kann allein mit einer Zunahme der relativen Permeabilität an der luminalen Membranseite erklärt werden.

Bei der chronischen Aldosteronwirkung muß eine Normalisierung der peritubulären Membranpumpe und damit eine Wiederauffüllung des intrazellulären K-Pools angenommen werden.

Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Steroidhormone läßt

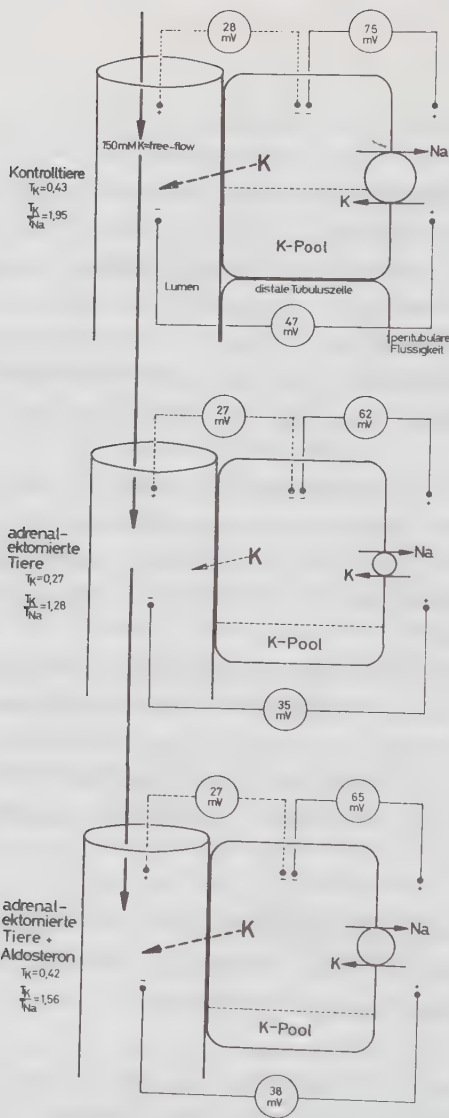


Abb. 16 : Schematische Darstellung der Kaliumsekretion im distalen Tubulus.

sich z.Z. nicht eindeutig beantworten. Sowohl die Hypothese, daß Aldosteron auf den Natriumtransport über eine Stimulierung der Proteinsynthese wirkt (+), als auch die Hypothese einer primären Permeabilitätsänderung (26) werden diskutiert. Es konnte sowohl an der Ratteniere (6,36,42) als auch an isolierten Membranen (3,4) gezeigt werden, daß Hemmstoffe der Proteinsynthese den Aldosteronabhängigen Na-Transport hemmen.

Diese Befunde wurden als wesentlicher Beweis für eine Stimulierung der Proteinsynthese durch Aldosteron herangezogen.

Einige Untersuchungen zeigen jedoch (Lit. bei 27), daß Hemmstoffe der Proteinsynthese auch unspezifische Reaktionen auslösen können.

Auch in den Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde Cycloheximid, das die Anlagerung von Aminosäuren an transfer RNS verhindert und Actinomycin D, das auf die DNS-abhängige RNS-Synthese wirkt, verwandt.

Bei gleichzeitiger Verabreichung von Aldosteron und Cycloheximid konnte der akute Effekt von Aldosteron auf die relative Kaliumpermeabilität nicht unterdrückt werden.

Cycloheximid wurde dabei in einer Dosierung verwandt, die nach vergleichbaren Zeiten zu einer massiven Hemmung des Einbaues von Aminosäuren und damit zu einer Hemmung der Proteinsynthese geführt hat (28).

Actinomycin D hatte in einer Dosierung, die sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus den aldosteronabhängigen Na-Transport hemmt (36) und in der verwandten Dosierung ebenfalls zu einer Hemmung der Proteinsynthese führt (6) bei Kontrollratten keinen Einfluß auf die relative

Kalium-Permeabilität. Der Befund, daß der Effekt von Aldosteron auf die relative Permeabilität der luminalen Membranen für Kalium durch Hemmstoffe der Proteinsynthese nicht zu beeinflussen ist, läßt sich damit erklären, daß der Mechanismus der relativen Permeabilitätsänderung ein direkter Membraneffekt ist, der durch die Proteinsynthese nicht beeinflußt wird.

Die Befunde schließen jedoch nicht aus, daß bei der Änderung der Permeabilität eine Änderung der Proteinsynthese beteiligt ist. Hierbei müßte man jedoch annehmen, daß das fraglich induzierte Protein (Permease ?) gegen Hemmstoffe der Proteinsynthese weniger oder völlig unempfindlich ist als das induzierte Protein, das am aktiven Na-Transport beteiligt ist.

Kaliumtransport am proximalen Tubulus

Etwa 2/3 des filtrierten Kaliums wird im proximalen Tubulus unter Kontrollbedingungen resorbiert (11). Die Frage, ob Kalium im proximalen Tubulus aktiv resorbiert wird, ist nicht eindeutig geklärt. Unter der Annahme einer transtubulären Potentialdifferenz im proximalen Tubulus von etwa 0 mV (8) ist es nicht erforderlich, einen aktiven Transportmechanismus für Kalium unter Freifluß-Bedingungen zu postulieren.

Unter sogenannten "Gleichgewichtsbedingungen" kann man jedoch zeigen, daß auch im proximalen Tubulus eine Konzentrationsdifferenz für Kalium zwischen Tubuluslumen und extrazellulärer Flüssigkeit aufgebaut werden kann (41).

Dieser Befund ist zur Zeit der einzige Hinweis, daß auch im proximalen Tubulus Kalium aktiv transportiert wird.

In der Nebennierenrindeninsuffizienz ist die prozentuale Resorption von

Kalium unter Bedingungen des freien Flusses unverändert (2,32). Unter Gleichgewichtsbedingungen läßt sich aber zeigen, daß auch im proximalen Tubulus der Kaliumtransport ähnlich wie der Na-Transport durch Aldosteron beeinflusst und durch Actinomycin gehemmt werden kann (41).

Bei der Interpretation von Transportprozessen im proximalen Tubulus ist jedoch zu berücksichtigen, daß hier im Gegensatz zum distalen Tubulus ein interzellulärer Shunt besteht, der die Größe des transtubulären Elektrolyttransportes wesentlich beeinflusst (9,43).

Bei Perfusion des proximalen Tubulus mit Lösungen verschiedener Kaliumkonzentrationen wurden mit elektrophysiologischen Methoden Ergebnisse erzielt, die denen im distalen Tubulus qualitativ entsprechen.

Verglichen mit dem distalen Tubulus ist die Transportnummer für Kalium zwar niedriger, das Verhältnis der relativen Permeabilitäten von Kalium zu Natrium entspricht jedoch denen im distalen Tubulus.

Das bedeutet, daß auch im proximalen Tubulus Kalium relativ leichter in die Zelle permeieren kann als Natrium, daß insgesamt aber die luminale Membran keine ausgesprochene Selektivität für Kalium besitzt.

Es ist möglich, daß eine Resorptionspumpe an der Aufnahme von Kalium in die Zelle beteiligt ist, die Transportnummer erfaßt jedoch nur die passiven Vorgänge an einer Membran (9). Das peritubuläre Membranpotential, das etwas niedriger ist als im distalen Tubulus, ist auch im proximalen Tubulus wie im distalen Tubulus bei Fehlen von Nebennierenrindensteroiden erniedrigt.

Dieser Befund paßt zu den oben zitierten Ergebnissen, daß im proximalen

Tubulus sowohl die Natrium- als auch die Kaliumresorption in der Nebenniereninsuffizienz vermindert sind.

Ob die Größe des intrazellulären Kalium-Pools im proximalen Tubulus für den transtubulären Kaliumtransport von irgendeiner Bedeutung ist, läßt sich zur Zeit nicht klären.

Aufgrund der relativen Permeabilitäten kann jedoch gesagt werden, daß auch im proximalen Tubulus offensichtlich die luminale Membran in der Nebenniereninsuffizienz weniger durchlässig ist für Kaliumionen und daß dieser Effekt durch akute Verabreichung von Aldosteron normalisiert und durch Hemmstoffe der Proteinsynthese nicht beeinflußt werden kann. Das peritubuläre Membranpotential ist nach akuter Aldosteronverabreichung unbeeinflußt.

Zusammenfassend lassen sich die proximalen Daten damit erklären, daß die transtubuläre Kaliumresorption in der Nebennierenrindeninsuffizienz vermindert und durch Aldosteron wieder normalisierbar ist. Dieser Mechanismus ist beeinflussbar durch Actinomycin D (41). Betrachtet man die luminale Zellmembran, so ergibt sich, daß ähnlich wie im distalen Tubulus die relative Permeabilität für Kalium gegenüber Natrium vermindert und durch Aldosteron normalisiert werden kann. Dieser Effekt auf die relative Permeabilität wird durch Hemmstoffe der Proteinsynthese nicht beeinflußt.

Ob die Änderung der relativen Permeabilität an der luminalen Membranseite für den transtubulären Transport von Kalium von quantitativer Bedeutung ist, kann aufgrund unserer Untersuchungen nicht eindeutig ausgesagt werden.

44 Natriumtransport im distalen Tubulus

Im distalen Tubulus der Rattenniere wird Natrium gegen ein Konzentrationsgefälle aktiv aus dem Tubuluslumen resorbiert. Die intraluminalen Natriumkonzentration nimmt längs des Tubulus ab. In der Nebennierenrindeninsuffizienz sind die Netto-Na-Resorptionen im distalen Tubulus erniedrigt (15) und die Na-Konzentration im distalen Tubuluslumen erhöht (16). Beide Größen können durch akute Verabreichung von Aldosteron normalisiert werden (16,40).

Da die prozentuale Flüssigkeit- und Na-Resorption im proximalen Tubulus in der Nebennierenrindeninsuffizienz normal oder eher sogar erhöht ist (15), sind für die vermehrte Ausscheidung von Natrium bei Fehlen von Mineralocorticoiden vorwiegend der distale Tubulus und das Sammelrohrsystem verantwortlich.

Bei Perfusion des distalen Tubulus mit verschiedenen Natriumkonzentrationen ergab sich eine Transportnummer für Natrium von 0,22 bei Kontrolltieren und ein Verhältnis der Transportnummer Kalium/Transportnummer Natrium bzw. Kaliumleitfähigkeit/Natriumleitfähigkeit von 1,95.

Bei adrenaletomierten Tieren war die Transportnummer für Natrium gegenüber Kontrollen nicht verändert, jedoch nahm der Quotient der relativen Leitfähigkeiten von Kalium und Natrium ab.

Verabreichung von Aldosteron führte innerhalb von 2-4 Std. zu einer Zunahme von T_{Na} auf 0,27.

Da sich jedoch die relative Leitfähigkeit für Kalium stärker änderte als die für Natrium, wurde das Verhältnis T_K/T_{Na} mit 1,56 nicht vollständig normalisiert. Die signifikante Änderung von T_{Na} bei adrenaletomierten Ratten durch akute Gabe von Aldosteron macht es wahrscheinlich, daß die

relative Leitfähigkeit für Natrium an der luminalen Zellmembran des distalen Tubulus durch Aldosteron vergrößert wird.

Überraschend ist dabei, daß zwischen Kontrolltieren und adrenaletomierten Tieren ohne Hormonsubstitution kein Unterschied in der relativen Natriumleitfähigkeit bestand und daß die relative Leitfähigkeit bei adrenaletomierten Tieren durch Aldosteron über den Kontrollwert gesteigert wurde. Da die Versuche bei allen Versuchsgruppen nach einer Infusion von etwa 4 ml 0,9 % NaCl (2 ml/100 g) durchgeführt wurden, ist der fehlende Unterschied der relativen Natriumleitfähigkeit zwischen Kontrolltieren und adrenaletomierten Tieren wahrscheinlich auf einen Hypoaldosteronismus bei Kontrolltieren in Kochsalzdiurese zurückzuführen.

Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß intravenöse Verabreichung von Aldosteron auch bei Kontrolltieren zu einer weiteren Abnahme des Na/K-Quotienten im Urin von Kontrolltieren führte (Abb.2), d.h., daß Aldosteron auch bei Kontrolltieren die Elektrolytausscheidung noch signifikant beeinflusste.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigen diese Annahme insofern, als Aldosteron auch bei Kontrolltieren die relative Leitfähigkeit für Natrium steigerte. T_{Na} entsprach bei Aldosteron-substituierten Kontrolltieren T_{Na} bei adrenaletomierten Tieren nach Aldosteronverabreichung. Gleichzeitige Verabreichung von Cycloheximid mit Aldosteron verringerte zwar T_{Na} , ein eindeutig signifikanter Unterschied war jedoch nicht nachweisbar.

Messungen der Natriumpermeabilität sind bisher am distalen Tubulus nicht durchgeführt worden. Unveröffentlichte Befunde von HEGEL und LANGE zeigten, daß der effektive Gesamtwiderstand der distalen Tubulus-

membran bei adrenaletomierten Ratten abfällt. Wie groß jedoch der Anteil des Na-Ions an dieser Änderung ist, kann aus diesen Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Für das Sammelrohrsystem wurde aufgrund von Tracer-Messungen postuliert, daß Aldosteron die Tracer-Permeabilität für Natrium im Sammelrohr erniedrigt (34). Allerdings ergab sich bei diesen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollratten und adrenaletomierten Ratten und ebenfalls kein Unterschied zwischen Kontrollratten mit und ohne Aldosteron.

Ein signifikanter Unterschied wurde lediglich bei dem Vergleich zwischen adrenaletomierten Ratten und Kontrollratten mit Aldosteronsubstitution gefunden.

Vergleicht man die in dieser Arbeit dargelegten Untersuchungen, so muß nochmals betont werden, daß mit der Transportnummer lediglich relative Permeabilitäten angegeben werden können, Aussagen über die absoluten Permeabilitäten jedoch nicht möglich sind. Aus diesem Grunde ist ein Vergleich der verschiedenen hier zitierten Untersuchungsmethoden schwer möglich.

Natriumtransport im proximalen Tubulus

Im proximalen Tubulus wird Natrium aktiv resorbiert, die Na-Konzentration ändert sich längs des proximalen Tubuluslumens unter Bedingungen des freien Flusses jedoch nicht. Bei adrenaletomierten Ratten ist die Nettoresorption von Natrium im proximalen Tubulus vermindert und kann durch akute oder chronische Verabreichung von Aldosteron wieder normalisiert werden (15, 40).

Aufgrund der Befunde, daß einerseits der Netto-Natriumtransport in der Nebennierenrindeninsuffizienz vermindert ist, andererseits jedoch der

maximale Konzentrationsquotient für Natrium unter sog. "Gleichgewichtsbedingungen" nicht verändert ist, wurde postuliert, daß der passive Rückstrom von Natrium im proximalen Tubulus durch Fehlen von Mineralocorticoiden vermindert ist (15).

Bei Kontrollratten wurde im proximalen Tubulus ein T_{Na} von 0,11 gefunden. Dieser Wert ist deutlich niedriger als im distalen Tubulus, das Verhältnis der Transportnummern von Kalium zu Natrium bzw. die relativen Leitfähigkeiten der Ionen zueinander verhält sich im proximalen Tubulus ebenso wie im distalen Tubulus. Die Transportnummer für Natrium liegt deutlich niedriger als Vergleichswerte von anderen Autoren (1,9). Die in der Literatur angegebenen Werte wurden jedoch entweder an der isolierten Hundeniere (1) gewonnen oder an der Ratteniere, wobei jedoch für die Berechnung der Transportnummer lediglich die maximalen Änderungen der Potentialdifferenz bei Änderung der Na-Konzentration im Tubuluslumen herangezogen wurden (9).

Die Transportnummer für Natrium bleibt bei adrenalectomierten Tieren im proximalen Tubulus ebenso wie im distalen Tubulus gegenüber Kontrollratten unverändert. Das Verhältnis der Transportnummer K/Na wird wie im distalen Tubulus auf 1,27 erniedrigt, was auf eine Abnahme der relativen Leitfähigkeit von Kalium zurückzuführen ist.

Wie im distalen Tubulus erhöht Aldosteron sowohl bei adrenalectomierten Ratten als auch bei Kontrolltieren die relative Leitfähigkeit für Natrium im proximalen Tubulus. Diese Befunde stimmen mit Untersuchungen von GUTSCHE et al. (13) überein; in seinen Versuchen zeigte sich, daß Aldosteron die Natriumpermeabilität im proximalen Tubulus steigert.

Wie im distalen Tubulus konnte gleichzeitige Verabreichung von Cycloheximid mit Aldosteron die relative Leitfähigkeit für Natrium vermindern, im proximalen Tubulus war der Unterschied jedoch hoch signifikant ($P < 0,001$).

Zusammenfassend lassen sich die Messungen bezüglich der relativen Leitfähigkeit von Natrium an der luminalen Membran dahingehend deuten, daß Aldosteron sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus die relative Leitfähigkeit für Natrium erhöht. Diese Annahme entspricht der schon früher postulierten Änderung der Na-Permeabilität im proximalen Tubulus (15) und entspricht dem insbesondere von der Arbeitsgruppe um LEAF und SHARP (26,27) postulierten Wirkungsmechanismus von Aldosteron an isolierten Membranen.

Die in dieser Arbeit angegebenen Änderungen der relativen Permeabilität für Natrium erlauben jedoch keine eindeutige quantitative Aussage, inwieweit die beschriebenen Änderungen an der transtubulären Netto-Resorption von Natrium beteiligt sind.

5 Zusammenfassung

Zur Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Aldosteron auf den Kalium- und Natriumtransport im proximalen und distalen Tubulus der Rattenniere wurden Tubuli mit verschiedenen Kalium- und Natriumkonzentrationen durchströmt und die bei Änderung der intraluminalen Konzentration auftretenden Änderungen der trans-tubulären Potentialdifferenz registriert. Außerdem wurde das Membranpotential der peritubulären Zellseite bei den verschiedenen Versuchsgruppen gemessen.

Dabei ergaben sich folgende Punkte:

1.) Die verminderte Kaliumsekretion des distalen Tubulus in der Nebenniereninsuffizienz ist auf eine Verminderung der relativen Kaliumpermeabilität an der luminalen Membran und auf eine Verminderung der aktiven Aufnahme von Kalium an der peritubulären Membran zurückzuführen. Die Stimulierung der Kaliumsekretion durch akute Verabreichung von Aldosteron kann mit der Zunahme der relativen Permeabilität an der luminalen Membranseite erklärt werden.

2.) Ebenso wie am distalen Tubulus ist die relative Permeabilität für Kalium in der Nebenniereninsuffizienz an der luminalen Zellmembran des proximalen Tubulus erniedrigt und kann durch Aldosteron normalisiert werden.

3.) Die relative Permeabilität für Natrium an der luminalen Zellmembran des distalen Tubulus ist nicht unterschiedlich zwischen Kontrolltieren und adrenaletomierten Ratten. Die Vermutung, daß der fehlende Unterschied auf einen Hypoaldosteronismus zurückzuführen ist, wird dadurch unterstützt, daß Aldosteron bei adrenaletomierten Tieren

und Kontrollen die relative Permeabilität für Natrium über den Wert steigert, den man bei Kontrolltieren ohne Aldosteronsubstitution findet.

- 4.) Am proximalen Tubulus finden sich analoge Verhältnisse. Auch hier erhöht Aldosteron die relative Permeabilität für Natrium.

Weiterhin wurden peritubuläre Membranpotentiale am proximalen und distalen Tubulus gemessen. Dabei zeigte sich, daß bei adrenalectomierten Tiere das Membranpotential signifikant erniedrigt war gegenüber Kontrolltieren. Durch akute Gabe von Aldosteron konnte dieses Potential nicht erhöht werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse tragen damit zur Erklärung des Mechanismus in der Nebenniereninsuffizienz bei.

1. BOULPAEP, E.L. and J.F. SEELY: Electrophysiology of proximal and distal tubules in the autoperfused dog kidney. *Am.J.Physiol.* 221, 1084 (1971).
2. CORTNEY, A.: Renal tubular transfer of water and electrolytes in adrenalectomized rats. *Am.J.Physiol.* 216, 589 (1969).
3. CRABBE, J. and P. de WEER: Action of aldosterone on the bladder and skin of the toad. *Nature (Lond.)* 202, 298 (1964).
4. EDELMAN, J.S., R. BOGOROCH, and G.A. PORTER: On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of protein synthesis. *Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.)* 50, 1169 (1963).
5. FEIN, H.: Passing current through recording glass micro-pipette electrodes. *IEEE Trans.Biomed.Eng.* 13, 211 (1966).
6. FIMOGNARI, G.M., D.D. FANESTIL, and J.S. EDELMAN: Induction of RNA and protein synthesis in the action of aldosterone. *Amer.J.Physiol.* 213, 954 (1967).
7. FRANK, K. and M.C. BECKER: Microelectrodes for recording and stimulation. In: *Physical techniques in biological research*. Vol.V, edited by W.L. Nastuk, *Electrophysiological Methods*, part A, Academic Press, New York and London (1964).
8. FRÖMTER, E. und U. HEGEL: Transtubuläre Potentialdifferenzen an proximalen und distalen Tubuli der Rattenniere. *Pflügers Arch.* 291, 107 (1966).

9. FRÖMTER, E., C.W. MÜLLER, T. WICK: Permeability properties of the proximal tubular epithelium of the rat kidney studied with electrophysiological methods. In: "Electrophysiology of Epithelial Cells", Symposium Schloß Reinhardshausen, Okt. 1970, Chairman: G. Giebisch, FK Schattauer Verlag, Stuttgart-New-York (1971).
10. GALASKE, R., W. GALASKE und M. STEINHAUSEN: Beeinflussen Passagezeit-Bestimmungen die renale Natriumausscheidung der Ratte ? Pflügers Arch. 319, R 78 (1970).
11. GIEBISCH, G., R.M. KLOSE, and G. MALNIC: Renal tubular potassium transport. Bull.schweiz.Akad.med.Wiss. 23, 287 (1967).
12. GIEBISCH, G., G. MALNIC, R.M. KLOSE, and E.E. WINDHAGER: Effect of ionic substitution on distal potential differences in rat kidney. Amer.J.Physiol. 211, 560 (1966).
13. GUTSCHE, H.U., S. LANGE, and U. HEGEL: Influx of electrolytes into the proximal tubule of rat kidney under the influence of aldosterone (Electrical measurements). V.Int.Congr.Nephrol. Mexico (1972).
14. HANSEN, L.: Clearance Untersuchungen zur Wirkung von Aldosteron auf den Kalium- und Natriumtransport in der Rattenniere. (Einfluß von Hemmstoffen der Proteinsynthese und Änderung der Kaliumzufuhr) Inauguraldissertation, Berlin (1973).
15. HIERHOLZER, K., M. WIEDERHOLT und H. STOLTE unter technischer Mitwirkung von B.BRAATZ und S.KAPPLA: Hemmung der Natriumresorption im proximalen und distalen Konvolut adrenalectomierter Ratten. Pflügers Arch. 291, 43 (1966).

16. HIERHOLZER, K., M. WIEDERHOLT, H. HOLZGREVE, G. GIEBISCH, R.M. KLOSE, and E.E. WINDHAGER: Micropuncture study of renal transtubular concentration gradients of sodium and potassium in adrenalectomized rats. *Pflügers Arch.* 285, 193 (1965).
17. HODGKIN, A.L. and P. HOROWICZ: The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J.Physiol.* 148, 127 (1959).
18. KHURI, R.N., S.K. AGULIAN, and A. KALLOGHLIAN: Intracellular potassium in the cells of the distal tubule. *Pflügers Arch.* im Druck.
19. KOHLRAUSCH, F.: *Praktische Physik*, Band 2, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1968).
20. LEAF, A.: Transepithelial transport and its hormonal control in toad bladder. *Ergeb.Physiol.* 56, 216 (1965).
21. MALNIC, G., R.M. KLOSE, and G. GIEBISCH: Micropuncture study of renal potassium excretion in the rat. *Amer.J.Physiol.* 206, 674 (1964).
22. MOORE, J.W. and K.S. COLE: Voltage clamp techniques. In: *Physical techniques in biological research*, Vol. VI, *Electrophysiological Methods*, Part B, Editor: W.L. Nastuk, Academic Press New York and London, p. 280 (1963).
23. MÜLLER, P.: Experiments on current flow and ionic movements in single myelinated nerv fibers. *Exp.Cell.Res.* 5, 118 (1958).

24. NETTER, H.: Theoretical Biochemistry. Oliver & Boyd, Edinburgh (1970).
25. RICHTERLICH, M.: Klinische Chemie, Theorie und Praxis. Akad. Verlagsanstalt Frankfurt/Main (1965).
26. SHARP, G. and W.G. LEAF: Biological action of aldosterone in vitro. Nature (Lond.) 202, 1185 (1964).
27. SHARP, G.W.G. and A. LEAF: Mechanism of action of aldosterone. Physiol.Rev. 46, 593 (1966).
28. SISLER, H.D., and M.R. SIEGEL: Cycloheximide and other glutarimide antibiotics. In: Antibiotics. D.Gottlieb and P.D.Shaw, editors. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, I, 283 (1967).
29. SINGER, B. and M.P. STACK-DUNNE: The secretion of aldosterone and corticosterone by the rat adrenal. J.Endocr. 12,130 (1955).
30. STEINHAUSEN, M.: Eine Methode zur Differenzierung proximaler und distaler Tubuli der Nierenrinde von Ratten in vivo und ihrer Anwendung zur Bestimmung tubulärer Strömungsgeschwindigkeiten, Pflügers Arch. 277, 23 (1963).
31. STOLTE, H., J.P. BRECHT, M. WIEDERHOLT und K. HIERHOLZER: Einfluß von Adrenalectomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität cortikaler Nephronabschnitte der Rattenniere. Pflügers Arch. 299, 99 (1968).

32. STOLTE, H., M. WIEDERHOLT, G. FUGHS, and K. HIERHOLZER:
Time course of development of transtubular sodium concentration differences in proximal surface tubules of the rat kidney. *Pflügers Arch.* 313, 252 (1969).
33. TASAKI, I., E.H. POLLEY, and F. ORREGO: Action potentials from individual elements in cat geniculate and striate cortex. *J. Neurophysiol.* 17, 454 (1954).
34. UHLICH, E., R. HALBACH und K.J. ULLRICH: Einfluß von Aldosteron auf den Ausstrom markierten Natriums aus den Sammelrohren der Ratte. *Pflügers Arch.* 320, 261 (1970).
35. WICK, T. und E. FRÖMTER: Das Zellpotential des proximalen Konvolutes der Rattenniere in Abhängigkeit von der peritubulären Ionenkonzentration. *Pflügers Arch.* 294, R 17 (1967).
36. WIEDERHOLT, M.: Mikropunktionsuntersuchungen am proximalen und distalen Konvolut der Rattenniere über den Einfluß von Actinomycin D auf den mineralocorticoidabhängigen Na-Transport. *Pflügers Arch.* 292, 334 (1966).
37. WIEDERHOLT, M. und B. WIEDERHOLT: Der Einfluß von Dexamethason auf die Wasser- und Elektrolytausscheidung adrenaletomierter Ratten. *Pflügers Arch.* 302, 57 (1968).
38. WIEDERHOLT, M., K. HIERHOLZER und J.P. BRECHT: Die Wirkung von Aldosteron und Cortison auf den tubulären Na-Transport adrenaletomierter Ratten. *Pflügers Arch.* 283, 71 (1965).

39. WIEDERHOLT, M., W.J. SULLIVAN, and G. GIEBISCH: Potassium and sodium transport across single distal tubules of *Amphiuma*. *J.Gen.Physiol.* 57, 495 (1971).
40. WIEDERHOLT, M., H. STOLTE, J.P. BRECHT und K. HIERHOLZER: Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenaletomierter Ratten. *Pflügers Arch.* 292, 316 (1966).
41. WIEDERHOLT, M., C. BEHN, W. SCHOORMANS, and L. HANSEN: Effect of aldosterone on sodium and potassium transport in the kidney. *J.Steroid.Biochem.* 3, 151 (1972).
42. WILLIAMSON, H.E.: Mechanism of the antidiuretic action of aldosterone. *Biochem. Pharmacol.* 12, 1449 (1963).
43. WINDHAGER, E.E., E.L. BOULFAEP, and G. GIEBISCH: Electrophysiological studies on single nephrons. *Proc.Int.Congr. Nephrol.* 3rd, Washington, D.C. 1966, 35 (1967).
44. WRIGHT, F.S.: Increasing magnitude of electrical potential along the renal distal tubule. *Amer.J.Physiol.* 220, 624 (1971).

Während meiner Zeit im Institut für Klinische Physiologie habe ich die gute Zusammenarbeit mit allen Institutsangehörigen kennengelernt. Ich danke Herrn Prof.Dr.med. K. Hierholzer dafür, daß er mir die Durchführung der Experimente im Institut für Klinische Physiologie ermöglicht hat und mir bei der Durchsicht der Arbeit behilflich war.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med.M.Wiederholt. Er gab mir das Thema, führte mich in die Methode ein und war stets dazu bereit, bei auftretenden Schwierigkeiten zu helfen. Ich habe gerne mit ihm zusammengearbeitet.

Lebenslauf

Am 12. August 1944 wurde ich, Wilko Schoormans, als 2. Kind des Mathematikers Julius Schoormans und seiner Ehefrau Martha, geb. Wilken, in Norden, Ostfriesland geboren.

1951 besuchte ich die Volksschule in Norden, wechselte nach 8 Monaten wegen beruflicher Veränderungen meines Vaters in die Volksschule Köln-Rath über und kam 1955 auf das neusprachliche Gymnasium in Köln-Deutz. Nach einem erneuten Wechsel auf die Leibnizschule in Hannover schloß ich die dortige Ausbildung 1965 mit dem Abitur ab. Nach 2jähriger Wehrdienstzeit begann ich im SS 1967 das Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin, bestand im September 1969 die ärztliche Vorprüfung und im März 1973 die ärztliche Prüfung.

